UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue e plasma

Jairo Lisboa Rodrigues

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue e plasma

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Jairo Lisboa Rodrigues

Orientador: Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto

2010

RODRIGUES, J. L.	<p> Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue em sangue e plasma </p>		DOUTORADO FCFRP-USP 2010
---------------------	---	--	--------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha Catalográfica

Rodrigues, Jairo Lisboa

Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue e plasma. Ribeirão Preto, 2010.

124p.:il; 30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Dr. Fernando Barbosa Júnior

1. Especiação 2. Vapor frio 3. Mercúrio 4. HPLC-ICP-MS 5. GC-ICP-MS 6. Sangue

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jairo Lisboa Rodrigues

Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue e plasma

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

**"Mais importante que adquirir uma
grande sabedoria é ter humildade
na hora de transmiti-la."
*Benjamin Franklin***

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, meu guia, em quem tenho muita fé e que está sempre a me proteger. Dedico também aos indivíduos das populações Ribeirinhas do Rio Tapajós, Amazônia Brasileira.

Agradecimentos

À Deus, fonte de vida e sabedoria, por tudo que sempre fez e faz por mim.

Aos meus pais Joaquim Rodrigues e Terezinha das Graças, fontes de sabedoria, conhecimento e inspiração. Verdadeiros doutores em espiritualidade e experiência de vida.

Aos meus irmãos Izac e Sara pela amizade, carinho e apoio que sempre me proporcionaram durante toda minha vida.

A todos os meus amigos que me apóiam, em especial ao Bruno Alves e Bruno Lemos por me ajudarem, aconselharem e fazerem parte dessa minha caminhada.

Ao meu Orientador Dr Fernando Barbosa Junior por todos os ensinamentos, conselhos e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr Samuel Simião, pela co-orientação e apoio nesse trabalho.

Aos integrantes do grupo de espectrometria atômica e de massas da UFSC (Florianópolis), em especial ao Dr Adilson Curtius e aos doutorandos Daiane e Luciano pela colaboração com os experimentos do vapor frio.

Aos integrantes do grupo de química analítica da Faculdade de Ciências químicas e do Meio ambiente: Dra Rosa del Carmen Rodriguez, Dr Francisco Javier, Dra Nuria Rodriguez e à doutoranda Carolina Rodriguez (*Universidad de Castilla-La Mancha, Toledo, España*) pelo período sandwich na Europa, e por todo ensinamento, confiança e apoio que me deram durante esse período que estive por lá.

À técnica Vanessa pela dedicação ao trabalho.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais: Denise, Kátia, Bruno, Juliana, Gustavo, Giovanna, Taisa, Vívian e a todos os novos integrantes.

À professora Dra Márcia Mesquita, pela ajuda com a espectrometria de massas.

Ao professor Dr José Anchieta pela colaboração com a instrumentação do vapor frio.

À minha namorada Márcia, por sempre me incentivar e me apoiar, sendo peça fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Ana e Rosana, pela ajuda durante esse período.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

Rodrigues, J. L. **Avaliação de técnicas acopladas à espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) visando o fracionamento e a especiação química de mercúrio em sangue e plasma.** 2010. 124f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O Mercúrio (Hg) é um dos mais tóxicos poluentes do meio ambiente. Ele existe basicamente em três formas: Mercúrio elementar (Hg^0), ou Hg metálico, mercúrio inorgânico (Hg-i), principalmente o cloreto mercúrico e o mercúrio orgânico (Hg-o), representado principalmente pelo metilmercúrio (MeHg) e etilmercúrio (EtHg), sendo que as formas orgânicas do Hg são mais tóxicas. Sendo assim, é de suma importância que se tenha métodos de fracionamento (Hg-t, Hg-i e Hg-o pela diferença) e de especiação de mercúrio (Hg-i, MeHg, EtHg) para diferenciação das espécies de mercúrio em matrizes biológicas. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de três métodos analíticos rápidos, simples e sensíveis para: i) fracionamento entre Hg-t e Hg-i em sangue/plasma (Hg-o pela diferença) utilizando sistema de geração de vapor frio em linha com ICP-MS (CV ICP-MS); ii) especiação de Hg em amostras de sangue e plasma utilizando o acoplamento HPLC-ICP-MS; iii) especiação de Hg em amostras de sangue utilizando o acoplamento GC-ICP-MS. No método de fracionamento de mercúrio foi feito o preparo de amostras utilizando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) à temperatura ambiente. No método de especiação por HPLC-ICP-MS foi feita a extração das espécies utilizando banho ultrassônico, ao passo que no método GC-ICP-MS foi feita a extração das espécies assistida por microondas. O método CV ICP-MS foi comparado com a geração de vapor utilizando absorção atômica (CV AAS) não tendo diferença estatística entre os dois métodos. Para validação dos métodos foi utilizado Material de Referência Certificado (NIST 966) e outros Materiais de Referência. Os métodos foram aplicados para análise de amostras de sangue de populações Ribeirinhas da Amazônia brasileira expostas ao mercúrio. Os métodos demonstraram ser simples e rápidos, podendo facilmente serem implantados em rotina de laboratórios clínicos.

Palavras chave: vapor frio, especiação, mercúrio, HPLC-ICP-MS, GC-ICP-MS, sangue

ABSTRACT

Rodrigues, J. L. **Evaluation techniques coupled to mass spectrometry (ICP-MS) aimed at the fractionation and chemical speciation of mercury in blood and plasma.** 2010. 124f. Thesis (Ph.D., Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010

Mercury (Hg) is one of the most toxic environmental pollutants. It exists primarily in three forms: elemental mercury (Hg⁰), or metallic mercury, inorganic mercury (Hg-i), particularly mercuric chloride and organic mercury (Hg-o), mainly represented by methylmercury (MeHg) and ethylmercury (EtHg), and the organic forms of mercury are more toxic than the inorganic ones. Then, it is very important the development of simple and fast methods for mercury fractionation (T-Hg, Hg-i and Hg-o by the difference) or speciation (Hg-i, MeHg, EtHg) in biological samples. Then, the aims of this work were to evaluate three analytical methods for: i) mercury fractionation in blood/plasma samples (Hg-t, Hg-i and Hg-o by difference) by using a ICP-MS on line coupled to a cold-vapor generation system (CV ICP-MS), ii) Hg speciation in blood and plasma by using LC coupled to ICP-MS; iii) Hg speciation in blood samples with the use of GC coupled to ICP-MS. For the fractionation method, samples were previously incubated with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) at room temperature. On the other hand, for the speciation of Hg in blood/plasma by using HPLC-ICP-MS the extraction of Hg species was carried out with the use of ultrasonic energy. For the speciation methodology with GC-ICP-MS the extraction of Hg species was carried out with the use of microwave-assisted extraction. Validation of the proposed methods were evaluated based on the analysis of the SRM NIST 966 and ordinary blood samples collected from riparians living in the Brazilian Amazon exposed to mercury. In general the proposed methodologies proved to be simple, fast and easily applied in routine analysis by clinical laboratories.

Keywords: Cold vapor, speciation, mercury, HPLC-ICP-MS, GC-ICP-MS, blood.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura representativa do mecanismo de entrada do MeHg para o interior das células do SNC por meio da ligação com cisteína (Figura adaptada de BRIDGES e ZALUPS, 2005)-----03
- Figura 2:** Estrutura tridimensional comparando complexo dicisteinilmercúrio (a) e cistina (b) (Adaptada de ZALUPS, 2000).-----04
- Figura 3:** Sistema MHS-15 de geração química de vapor com atomizador de quartzo (QTA) para fracionamento de Hg por CV AAS.-----30
- Figura 4:** Representação do Sistema de Injeção em Fluxo com geração de vapor frio de Hg e quantificação por ICP-MS (A=Amostra ou padrão, G= Gás de arraste (Argônio), W= Descarte, L/G= Separador de fases (Líquido/Vapor) R₁= Reagente 1(HCl; vazão 0,76mL/min), R₂= Reagente 2 (KMnO₄/L-Cisteína; vazão 1,2mL/min), R₃= Reagente 3 (NaBH₄/SnCl₂; vazão 1,2mL/min), P₁= Bomba peristáltica do ICP-MS, P₂= Bomba peristáltica Ismatec, W= Descarte (vazão 10mL/min).-----32
- Figura 5:** Representação esquemática do separador de fases (A) e fotografia do mesmo conectado ao ICP-MS (B)-----33
- Figura 6:** Acoplamento do Sistema HPLC-ICP-MS (A- Os 2 equipamentos instalados na Sala Limpa Classe 1000; B- Detalhe do acoplamento dos dois equipamentos com a conexão da HPLC na entrada do nebulizador do ICP-MS).-----35
- Figura 7:** Acoplamento do Sistema GC-ICP-MS (Observa-se o ICP-MS, GC e a interface que conecta os dois equipamentos).-----42
- Figura 8:** Esquema representativo do preparo de amostras de sangue por microondas para especiação de Hg por GC-ICP-MS-----47
- Figura 9:** Otimização da vazão do gás de arraste (argônio) para determinação de Hg-t em sangue e plasma. Sinal proveniente de uma solução de Hg-i 5µg L⁻¹ em sangue; condições experimentais de acordo com a Tabela 1.-----51
- Figura 10:** Otimização da concentração de KMnO₄ (2 amostras de sangue, sendo uma fortificada (spike) com Hg-i 5µg L⁻¹ e outra com MeHg 8µg L⁻¹; NaBH₄ 0,4%*m/v*; HCl 4,0%*v/v*, vazão do gás de arraste 0,75L/min).-----55
- Figura 11:** Otimização da concentração de L-cisteína na determinação de Hg-i em sangue (Amostras de sangue fortificadas (Spike) com MeHg 5µg L⁻¹, EtHg e Hg-i 5µg L⁻¹).----- 58
- Figura 12:** Estudo do tempo de sonicação na extração das espécies de Hg; porcentagem de extração de espécies de Hg presentes no material de referência SRM 966 NIST (Condições experimentais de acordo com a Tabela 2).-----69
- Figura 13:** Perfil cromatográfico demonstrando alteração do tempo de retenção das espécies de Hg devido a otimização da L-cisteína na especiação de Hg por HPLC-ICP-MS nas concentrações de (a) 0,05%*m/v* e (b) 0,4%*m/v*, utilizando padrão de Hg-i, MeHg e EtHg de 20µg L⁻¹ para cada espécie.-----72

Figura 14: Cromatograma representando a curva de calibração de cada espécie de Hg (Coeficientes de correlação Linear: Hg-i $R=0,9994$; MeHg: $R=0,9999$; EtHg: $R=0,9994$). Condições experimentais de acordo com a Tabela 2.-----76

Figura 15: Cromatograma apresentando a separação das 3 espécies em: B padrões contendo $10\mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie; A- sangue humano de indivíduo exposto ao Hg; Condições da análise vide Tabela 2.-----78

Figura 16: Cromatograma de espécies de mercúrio obtido após derivatização por etilação (a) e propilação (b) e quantificação por GC-ICP-MS.-----86

Figura 17: Especificação de mercúrio no material de referência NIST 966 por GC-ICP-MS, extração por microondas e derivatização por etilação (a) e propilação (b).-----89

Figura 18: Precisão entre dias, representada pela variação das concentrações das espécies de mercúrio em sangue (SRM NIST 966), sendo o intervalo de confiança do material de referência representado pelas linhas pontilhadas. Hg-t representado pela soma das espécies.-----92

Figura 19: Comparação direta dos métodos de especificação de Hg em sangue, GC-ICP-MS e HPLC-ICP-MS.-----95

Figura 20: Comparação de metodologias HPLC-ICP-MS e GC-ICP-MS para especificação de Hg em sangue utilizando gráfico comparativo proposto por Bland e Altman (1986, 1995).-----97

Figura 21: Comparação do método proposto para especificação de Hg por GC-ICP-MS com outros métodos existentes em literatura para especificação de amostras biológicas.-----98

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Condições operacionais da ICP-MS para fracionamento de Hg em amostras de sangue e plasma-----	28
Tabela 2: Condições operacionais para especiação de Hg em sangue e plasma por HPLC-ICP-MS-----	37
Tabela 3: Condições operacionais para especiação de Hg em sangue por GC-ICP-MS-----	43
Tabela 4: Testes de adição e recuperação para Hg-t e Hg-i por CV ICP-MS-----	60
Tabela 5: Comparação entre os métodos CV AAS e CV ICP-MS na determinação de Hg-t e Hg-i em sangue e plasma.-----	62
Tabela 6: Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de Hg-t e Hg-i por CV ICP-MS em sangue: comparação com outros métodos de fracionamento de Hg em amostras biológicas encontrados na literatura.-----	64
Tabela 7: Resultados obtidos de Hg-t e Hg-i (e por diferença Hg-o) de amostras de indivíduos ambientalmente expostos a MeHg e quantificação por CV ICP-MS-----	65
Tabela 8: Valores dos Materiais de Referência de sangue e plasma obtidos pelo método proposto de HPLC-ICP-MS.-----	74
Tabela 9: Especiação de mercúrio em amostras de populações ribeirinhas da Amazônia Brasileira expostas ambientalmente ao MeHg (Média (Desvio Padrão), n=3, ND=Não detectado).-----	79
Tabela 10: Efeito da quantidade de amostra (sangue) na extração de espécies de Hg por microondas para especiação por GC-ICP-MS-----	83
Tabela 11: Estudo do efeito da matriz (sangue) na especiação de Hg por GC-ICP-MS-----	84
Tabela 12: Figuras de mérito do método GC-ICP-MS por etilação e propilação. Precisão baseada em 5 leituras-----	87
Tabela 13: Concentrações obtidas do Material de Referência certificado NIST 966, sangue, material de referência NYS 07-06, também de sangue, e o material de referência de soro, 07S-04. Média (Desvio padrão); n=3; ND=Não detectado.-----	90
Tabela 14: Especiação química em amostras de sangue de populações Ribeirinhas da Amazônia Brasileira obtida por GC-ICP-MS-----	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV: Cold Vapor (Vapor frio)

EtHg: Etilmercúrio

GC: Cromatografia gasosa

Hg-i: Mercúrio inorgânico

Hg-o: Mercúrio orgânico

Hg-t: Mercúrio total

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente

MeHg: Metilmercúrio

R: Coeficiente de correlação linear

SD: Desvio Padrão

RSD: Desvio padrão relativo

SRM: Standard Reference Material (Material de referência certificado, NIST)

Eth-GC-ICP-MS: Especificação por GC-ICP-MS com derivatização por etilação

Prop-GC-ICP-MS: Especificação por GC-ICP-MS com derivatização por propilação

GC-ICP-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente.

HPLC-ICP-MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente.

CV ICP-MS: Vapor frio em linha com a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente.

SUMÁRIO

1-Introdução-----	01
1.1-O mercúrio-----	01
1.2-Determinação de Hg-t em sangue e plasma-----	06
1.3-Geração química de vapor-----	08
1.4-Fracionamento de Hg em sangue e plasma-----	11
1.5-Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS)-----	13
1.6-Especiação química de mercúrio-----	16
2-Objetivos-----	23
2.1-Estudo I-----	23
2.2-Estudo II-----	23
2.3- Estudo III-----	23
3. Justificativa-----	24
4- Material e Método-----	25
4.1-Estudo I - Fracionamento de mercúrio em sangue e plasma por geração de vapor frio (CV) e acoplamento no Espectrômetro de Massas com Plasma (CV ICP-MS)-----	25
4.1.1- Equipamentos e acessórios-----	25
4.1.2-Reagentes, soluções, materiais de referência e limpeza do material-----	25
4.1.3-Coleta de sangue de carneiro (sangue e plasma base)-----	27
4.1.4- Fracionamento de mercúrio em sangue por CV AAS (Método Comparativo)-----	29
4.1.5- Preparo das amostras-----	30
4.1.6-Sistema de Injeção em Fluxo com geração de vapor frio de Hg para quantificação por ICP-MS-----	32
4.1.7- Estudo do Efeito de Memória de Hg-----	34
4.2-Estudo II - Especiação química de mercúrio em sangue e plasma por acoplamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ao espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (HPLC-ICP-MS)-----	34
4.2.1-Equipamentos e acessórios-----	34

4.2.2-Especiação de Hg por HPLC-ICP-MS-----	35
4.2.3-Determinações de Hg-t em sangue e plasma-----	38
4.2.4-Reagentes e soluções-----	38
4.2.5-Preparo das amostras para especiação química de Hg-----	39
4.3-Estudo III: Especiação química de mercúrio em sangue por acoplamento da cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas com plasma (GC-ICP-MS)-	41
4.3.1-Equipamentos e acessórios-----	41
4.3.2-Especiação de Hg por GC-ICP-MS-----	42
4.3.3- Extração das espécies utilizando digestão em sistema fechado (microondas)-----	44
4.3.4-Reagentes e soluções-----	44
4.3.5-Preparo das amostras para especiação química de Hg por GC-ICP-MS-----	45
5-Resultados e discussão-----	49
5.1-Estudo I-----	49
5.1.1-Efeitos de memória do mercúrio -----	51
5.1.2-Avaliação da concentração de NaBH ₄ para fracionamento de Hg em amostras de sangue e plasma por CV ICP-MS-----	52
5.1.3-Otimização da concentração de KMnO ₄ para determinação de Hg-t-----	54
5.1.4-Otimização da concentração de SnCl ₂ e L-cisteína para determinação seletiva de mercúrio inorgânico em amostras de sangue e plasma-----	56
5.1.5-Testes de adição e recuperação de Hg-t e Hg-i em amostras de sangue e plasma-----	58
5.1.6-Estudos de validação-----	61
5.2-Estudo II-----	67
5.2.1-Avaliação do tempo de sonicação no processo de extração-----	68
5.2.2-Otimização das condições de operação do HPLC-----	69
5.2.3-Estudos de validação-----	73
5.2.4-Aplicação do método de especiação de Hg em amostras de sangue coletadas de populações Ribeirinhas da Amazônia Brasileira-----	76

5.2.5-Estabilidade das amostras de sangue após coleta para especiação de Hg-----	76
5.2.6-Estabilidade das espécies de mercúrio depois da extração-----	80
5.3-Estudo III-----	82
5.3.1- Otimização do preparo da amostra-----	82
5.3.2- Figuras de Mérito-----	87
5.3.3- Instabilidade do etilmercúrio em sangue-----	99
6- Conclusões-----	101
6.1-Estudo I-----	101
6.2-Estudo II-----	101
6.3- Estudo III-----	102
7-Referências Bibliográficas-----	103
8- Anexo-----	120

1-Introdução

1.1-O mercúrio

O Mercúrio (Hg) é um dos mais tóxicos poluentes do meio ambiente. Ele existe basicamente em três formas: Mercúrio elementar (Hg^0), ou Hg metálico, mercúrio inorgânico (Hg-i), principalmente o cloreto mercúrico e o mercúrio orgânico (Hg-o), representado principalmente pelo metilmercúrio (MeHg), sendo que as formas orgânicas do Hg são mais tóxicas do que as formas inorgânicas (ATSDR, 1999).

A principal fonte de exposição às formas orgânicas de Hg está no consumo de peixe ou de alimentos marinhos, sendo o metilmercúrio (MeHg) a principal espécie de mercúrio encontrada nestes alimentos (ATSDR, 1999). Além disso, o uso de vacinas contendo timerosal pode contribuir para exposição ao etilmercúrio (EtHg) (MARQUES et al., 2007).

Por outro lado, a exposição às formas inorgânicas é mais comum pela inalação do vapor de Hg originário de amálgamas dentários ou de atividades mineradoras de ouro (ATSDR, 1999). Cerca de 95% do MeHg ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal, entrando facilmente na corrente sanguínea, podendo se direcionar ao cérebro, onde fica alojado por um longo período. Aproximadamente 7% do Hg-i pode ser absorvido por via gastrointestinal, enquanto que para o Hg^0 menos de 0,01% é absorvido (LANNACCONE, 2001). No sangue, mais de 90% do MeHg está associado à hemoglobina contida nas hemácias, enquanto que o Hg-i está mais presente no plasma (cerca de 65 % do mercúrio total no plasma está sob a forma inorgânica). Entretanto, estes números podem variar significativamente entre indivíduos (LANNACCONE, 2001).

A meia-vida biológica de espécies orgânicas de mercúrio no sangue é significativamente maior que a de espécies inorgânicas. Após exposição, o MeHg permanece cerca de 50 dias no corpo (PRUSZKOWSKI et al., 1998).

O MeHg é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, acumulando-se nas células vermelhas do sangue e ligando-se facilmente a grupos sulfidrilas nas proteínas. As espécies orgânicas de mercúrio circulam no sangue por um longo período e gradualmente se acumulam no sistema nervoso central, onde os efeitos tóxicos são mais pronunciados.

Os principais efeitos adversos atribuídos à exposição ao mercúrio são: efeitos gastrointestinais, renais, músculo-esqueléticos, hepáticos, cardiovasculares e principalmente neurológicos (EBDON, 2001). O Hg-o pode atingir o Sistema Nervoso Central levando a quadros de neurotoxicidade. O primeiro sintoma é a parestesia e o primeiro sinal clínico é a ataxia, seguida em muitos casos de constrição visual e perda da audição (SEILER et al., 1987).

Um dos mecanismos aceitos para explicar o efeito tóxico do MeHg no Sistema Nervoso Central está em uma provável formação de um complexo entre o MeHg e o aminoácido cisteína, o qual tem uma estrutura semelhante ao aminoácido metionina. A Figura 1 apresenta a estrutura representativa do complexo formado (BRIDGES e ZALUPS, 2005).

Figura 1: Estrutura representativa do mecanismo de entrada do MeHg para o interior das células do SNC por meio da ligação com cisteína (Figura adaptada de BRIDGES e ZALUPS, 2005)

Após a entrada no SNC, o MeHg pode deprimir a síntese protéica levando à degeneração e necrose de neurônios, a longo prazo. Devido à ligação direta do Hg com grupos sulfidríla, pode ocorrer neuropatia periférica e degeneração de células ganglionares sensoriais primárias (KLAASEN et al., 2001).

O mercúrio inorgânico exerce seu efeito tóxico principalmente nos rins, podendo levar a lesão glomerular e a danos nos túbulos renais. De acordo com ZALUPS (2000) o efeito tóxico do Hg-i pode ser devido a sua ligação com duas moléculas de cisteína (dicisteinilmercúrio), tendo tal complexo formado uma

semelhança estrutural com a cistina, conforme estrutura tridimensional apresentada na Figura 2.

Figura 2: Estrutura tridimensional comparando complexo dicisteinilmercúrio (a) e cistina (b) (Adaptada de ZALUPS, 2000).

Os rins são o alvo primário para o acúmulo do mercúrio inorgânico e o segmento S₃ do túbulo proximal é o local inicial da toxicidade. O mercúrio (tanto inorgânico quanto orgânico) pode levar à necrose tubular aguda, provavelmente devido à ligação a sulfidrilas de enzimas renais, além de uma possível inativação de enzimas da bomba de sódio e potássio (KLAASEN et al., 2001).

Um dos casos mais conhecidos de contaminação por mercúrio ocorreu em 1953, em Minamata, no Japão, quando a *Chisso Fertilizer C. Ltda.* (uma das maiores indústrias do Japão, que fabricava fertilizantes químicos, resinas sintéticas, plásticos e compostos químicos) produzia o metilmercúrio como um subproduto do processo de produção do acetaldeído. Os resíduos eram despejados nas águas da baía de Minamata, onde haviam peixes que serviam de alimento para toda população local. Em indivíduos expostos após cinco anos da ocorrência da contaminação foram

encontradas concentrações de mercúrio extremamente elevadas no cabelo, variando de 2,46 a 705 $\mu\text{g/g}$. Em 1960, a concentração de mercúrio no lodo próximo ao canal de drenagem da indústria apresentava um valor de 2010 $\mu\text{g/g}$ em peso seco. Nos animais marinhos, as concentrações de mercúrio também foram elevadas: 35,7 $\mu\text{g/g}$ nos caranguejos e 5,61 $\mu\text{g/g}$ nas ostras. Ficou oficialmente reconhecido que 2252 pessoas foram diretamente contaminadas pelo metilmercúrio, sendo que 1043 óbitos ocorreram e 12127 pessoas manifestaram os sintomas da intoxicação (BISINOTI e JARDIM, 2004; AZEVEDO, 2003). Na década de 70, no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala ocorreram vários casos de contaminação de agricultores e seus familiares, que utilizavam grãos tratados com fungicidas à base de metil e etilmercúrio na confecção do pão caseiro. No caso particular do Iraque, mais de 6900 pessoas foram hospitalizadas e, pelo menos, 459 morreram. Em 1969, nos Estados Unidos, também houve uma intoxicação resultante da ingestão de carne de porcos alimentados com grãos tratados com fungicidas organomercuriais. A literatura apresenta vários casos de contaminação com mercúrio que vão desde a quebra de termômetros em hospitais e lares até a contaminação de lagos e rios por atividades industriais, principalmente de indústrias de cloro-álcali. Um caso recente ocorreu em Sorocaba, em SP, na Rede Ferroviária Federal, quando um vazamento de mercúrio contaminou dez adolescentes com idades entre 13 e 17 anos. O mercúrio metálico era proveniente de um reator elétrico desativado desmontado por saqueadores de sucata de cobre (BISINOTI e JARDIM, 2004).

Após anos da intensa atividade de mineração na Região Amazônica (Brasil), principalmente durante os anos 80, foram empregadas grandes quantidades de mercúrio no processo de amalgamação do ouro (BIDONE et al., 1997). Recentemente, tem sido evidenciado que esse enriquecimento relativo do mercúrio

em rios amazônicos não decorre apenas do extrativismo mineral, como foi demonstrado nos últimos anos, mas também ocorrendo devido a presença do metal nos solos de origem vulcânica da região (MAINVILLE et al., 2006).

A população que vive nas margens dos Rios Amazônicos apresenta uma alimentação baseada principalmente em peixes que bioacumulam grandes quantidades de MeHg. Assim, essas populações Ribeirinhas estão ambientalmente expostas principalmente às formas orgânicas do Hg. Alguns efeitos sobre a saúde já foram identificados nesta população, como alteração da pressão arterial (FILLION et al., 2006).

Concentrações de referência de mercúrio em sangue total de populações não expostas são tipicamente inferiores a $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg em adultos (AZEVEDO, 2003; SCHULZ et al., 2009). Em um estudo de Hippler et al. (2009) as concentrações de MeHg em sangue total de indivíduos não expostos foram inferiores a $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para uma melhor compreensão das rotas metabólicas, vias de intoxicação e as fontes de exposição ao mercúrio, é imprescindível diagnosticar não só a quantidade total de metal presente nos marcadores biológicos de dose interna como também identificar e quantificar a espécie química do metal presente tanto no marcador quanto no ambiente. Neste sentido, é crescente o interesse no desenvolvimento de métodos para especiação química de mercúrio (Azevedo, 2003).

1.2- Determinação de Hg-t em sangue e plasma

Guo e Baasner (1993) descreveram um método para determinação de Hg-t em sangue no qual era utilizada a digestão em linha das amostras por meio de um sistema de injeção em fluxo (FI) acoplado à espectrometria de absorção atômica

com vapor frio (CV AAS). Este método requer a diluição do sangue com reagente brometo/bromato, seguido pela decomposição em linha da amostra com HCl, usando aquecimento assistido por microondas. Nos Estados Unidos, este método tem sido usado em rotina com algumas modificações pelo Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) para determinações de Hg-t no sangue como parte do “National Health and Nutrition Examination Surveys” (CHEN et al., 1998; CDC, 2003). Entretanto, este método apresenta algumas desvantagens que incluem a formação de precipitados de resíduos orgânicos de sangue dentro do sistema de decomposição por microondas e constante necessidade de limpeza do sistema após algumas análises. Isso inviabiliza a análise em rotina em larga escala (PRUSZKOWSKI et al., 1998).

Além disso, os laboratórios clínicos atuais devem estar preparados para o aumento da demanda de análises de elementos traço em fluidos biológicos e tecidos, em resposta ao aumento da preocupação à exposição ambiental e ocupacional. Nesse propósito, o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) tem sido utilizado no pré-tratamento de amostras como uma alternativa à digestão assistida por microondas (HANNA e et al., 1993; SILVA et al., 1999; POZEBON et al., 2000; NÓBREGA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; BATISTA et al., 2008). TSENG et al. (1997) extraíram quantitativamente Hg-t de peixes à temperatura ambiente usando TMAH e um banho ultrassônico. Moreton e Delves (1998) também utilizaram TMAH no preparo de amostras de sangue para a determinação de Hg-t por ICP-MS.

Em 2004, Barbosa et al. desenvolveram um método para determinação de Hg-t em sangue por CV AAS. As amostras eram incubadas à temperatura ambiente com TMAH. O uso de tal metodologia apresentou inúmeras vantagens em relação à digestão assistida por microondas proposta por Guo e Bassner (1993), tais como a

eliminação da ocorrência de precipitados de proteínas no sistema, além de uma melhor frequência de amostragem e ganhos em sensibilidade. Este método é atualmente usado em rotina pelo Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque. Uma das vantagens do uso de TMAH no preparo das amostras se deve ao fato de ocorrer uma manutenção da integridade das espécies de Hg nas amostras. Neste sentido, o uso de tal procedimento poderia ser também aplicado não só para a determinação do Hg total quanto para o fracionamento e especiação de mercúrio.

A determinação do Hg-t em sangue e plasma é frequentemente utilizada como uma provável avaliação da exposição ao MeHg por indivíduos que se alimentam de peixe e acredita-se que a concentração do Hg-i seja muito menor quando comparada com o Hg-o. No entanto, a proporção de MeHg em sangue/plasma pode variar de indivíduo para indivíduo. Como existem diferenças nos efeitos tóxicos entre as diferentes espécies de mercúrio, torna-se necessário nos estudos de toxicologia do mercúrio e de avaliação de exposição, a diferenciação entre Hg total e inorgânico (fracionamento) ou a determinação das quantidades de espécies químicas de Hg individualmente (análise por especiação) em sangue e plasma. (KATSOYIANNIS et al., 2006).

1.3-Geração química de vapor

A geração química de vapor (CV) é uma técnica analítica bastante sensível na qual os analitos são vaporizados na forma de átomos ou moléculas gasosas através de uma reação química, geralmente à temperatura ambiente, com posterior transporte desses vapores para o local onde ocorre a quantificação.

A geração química de vapor pode ocorrer por diferentes métodos, dentre eles geração de hidreto (HG) para determinação de elementos como As, Bi, Pb, Sb, Se, e

Te, vapor frio (CV), para determinação de Hg e Cd, etilação, para determinação de Pb e Hg, e geração de carbonil, para determinação de Ni. Na geração química de vapor frio de Hg, o analito presente na amostra forma mercúrio metálico, uma espécie bastante volátil, ao reagir em meio ácido com o agente redutor tetraidroborato de sódio, NaBH_4 , ou com outros agentes redutores como o cloreto estânico (SnCl_2) (TAKASE et al., 2002).

Esse processo de geração química de vapor apresenta algumas vantagens:

- O vapor formado é homogêneo;
- Permite a separação do analito a partir da matriz potencialmente interferente;
- Permite estudos de fracionamento;
- Pode ser acoplada a diferentes técnicas (AAS, ICP OES, ICP-MS);
- Quando acoplado à ICP-MS propicia menor desgaste dos cones de amostragem e *skimmer*, já que a matriz orgânica é eliminada, diminuindo com isso grandes depósitos de carbono nos cones.

Entretanto, a geração química de vapor apresenta algumas desvantagens, uma vez que:

- A primeira etapa é uma reação química, sujeita a interferências;
- O estado de oxidação e forma (composto) do analito são críticos;
- Concomitantes da solução podem impedir na geração ou liberação do vapor;
- O pH da solução e as concentrações dos reagentes podem ser críticos;

- O mercúrio é particularmente sensível a reações de troca, o que pode causar perdas e contaminação (TAKASE et al., 2002).

Mecanismos de redução na geração química de vapor

O mecanismo da geração química de vapor frio tem sido alvo de relativamente poucas investigações. A primeira hipótese do mecanismo da geração de hidreto foi postulada por Robbins e Caruso em 1979, e é conhecida como mecanismo do “hidrogênio nascente”. Eles argumentaram que a espécie ativa no processo de derivatização/redução é o hidrogênio atômico, ou o “hidrogênio nascente”, o qual é proposto ser formado durante a hidrólise ácida do tetrahidroborato, ou seja:

Com o átomo de hidrogênio sendo responsável pela derivatização do elemento ao hidreto:

Onde m representa o estado de oxidação do analito e n o número de coordenação do hidreto. O excesso de hidrogênio atômico forma hidrogênio molecular, que é um dos produtos finais da hidrólise catalisada por ácido do tetrahidroborato, através de reações do tipo:

Quando se trabalha com geração química de vapor em amostras biológicas para que se tenha uma recuperação próxima a 100%, o ideal é que se utilize oxidantes como H_2O_2 , KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, que sejam capazes de transformar todas as formas de Hg da amostra em Hg^{2+} . Assim pode-se determinar quantitativamente e com uma boa sensibilidade o mercúrio total (WU et al., 2007).

Por outro lado, em estudos onde se pretende determinar tanto o Hg total quanto o Hg inorgânico, pode-se utilizar o tetrahidroborato em concentrações baixas já que, assim, ele não promoveria uma redução total do analito, sendo eficaz apenas para reduzir o Hg-i presente, podendo, nesta situação, determinar apenas o Hg-i. Outro reagente utilizado nesses estudos é o SnCl_2 que possui menor poder redutor quando comparado ao NaBH_4 , promovendo assim apenas a redução do Hg-i, não sendo eficaz na redução de espécies orgânicas de Hg. Porém, é comum utilizar junto ao SnCl_2 o reagente L-cisteína, já que, este último, é capaz de formar complexos estáveis com o mercúrio orgânico e, com isso, pode ajudar a evitar uma possível redução do Hg-o pelo SnCl_2 , mesmo que em pequenas quantidades (WU et al., 2007).

1.4-Fracionamento de Hg em sangue e plasma

O termo fracionamento é definido, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), como um processo de classificação de um analito ou um grupo de analitos em uma amostra de acordo com as propriedades químicas e físicas. Um dos exemplos de fracionamento é a determinação das concentrações de mercúrio total e inorgânico em uma determinada amostra (TEMPLETON et al., 2000).

Quando se faz a determinação de Hg, geralmente ocorre formação do vapor frio do elemento que pode ser quantificado por absorção atômica, espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente, entre outras. No processo de geração química de vapor frio, o fracionamento de Hg pode ser realizado utilizando, por exemplo, diferentes concentrações do reagente tetraidroborato de sódio, ou utilizando reagentes como tetraidroborato de sódio para determinação da concentração total do mercúrio e reagentes como cloreto estanoso para determinação seletiva do mercúrio inorgânico (TAKASE et al., 2002).

A utilização da espectroscopia de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) possibilita a diferenciação entre mercúrio total e mercúrio inorgânico. Com a utilização desta técnica foram propostos vários métodos para fracionamento de mercúrio. Alguns mais recentes, por exemplo, utilizaram a aplicação de diferentes temperaturas na célula de quartzo para diferenciação entre espécies orgânicas e inorgânicas (ZIMMER et al., 2002; LEAL et al., 2006). Após a formação de vapor de mercúrio e hidreto de metilmercúrio em um sistema em fluxo em meio de tetraidroborato de sódio, o mercúrio inorgânico era determinado sem aquecimento da cela de quartzo, ao passo que, com o aquecimento da cela, determinava-se o t-Hg (KAERCHER et al., 2005; TORRES et al., 2005). Porém, os limites de quantificação obtidos por estes métodos são superiores aos valores das concentrações de Hg normalmente encontrados em sangue e principalmente em plasma. Outros trabalhos propostos para determinação de Hg-t e Hg-i em amostras biológicas utilizaram concentrações diferenciadas de tetraidroborato de sódio (Segade e Bendicho, 1999). Por outro lado, Berglund et al., (2005) propuseram a utilização de reagentes como a L-cisteína e SnCl_2 para determinação apenas de Hg inorgânico e quantificação por absorção atômica.

1.5-Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS)

A determinação de metais em amostras clínicas é realizada em rotina com a utilização de várias técnicas analíticas, cabendo destaque para a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GF AAS), (ZHOU et al., 2002), espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES) (PROHASKA et al., 2000) e a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (FLAMENT et al., 2002). Dentre essas técnicas, a ICP-MS apresenta inúmeras vantagens devido ao fato de possibilitar análise multielementar, com elevada sensibilidade e alta taxa de amostragem (FLAMENT et al., 2002). Com o desenvolvimento da ICP-MS com cela de colisão e reação dinâmica, a técnica se mostrou altamente favorável para a determinação de muitos elementos em amostras clínicas, simplificando-se a etapa de pré-tratamento das amostras (KOPPENAAL et al., 2004).

O plasma acoplado indutivamente é uma fonte bem caracterizada de alta temperatura, apropriada para a atomização e ionização de espécies elementares. O plasma é formado numa tocha de quartzo, que consiste em três tubos concêntricos através dos quais flui gás argônio. O fluxo externo é chamado de gás de “plasma”, de resfriamento ou gás suporte e é introduzido tangencialmente na tocha. É este fluxo de gás que sustenta o ICP. O fluxo de gás central é chamado de “auxiliar” e é usado para manter o plasma afastado das laterais da tocha de quartzo. O fluxo interno de gás é conhecido como gás “nebulizador” e transporta a solução do analito para o plasma. Uma fonte de radiofrequência de 27,12 ou 40,68 MHz é acoplada à tocha usando-se um filamento metálico. Assim, campos elétricos e magnéticos oscilantes são formados no topo da tocha. O plasma é formado quando uma faísca é usada para produzir elétrons que são acelerados vetorialmente pelos campos

elétricos e magnéticos tendo energia suficiente para ionizar o gás argônio. Colisões sucessivas causam novas ionizações e o plasma se torna auto-sustentável. Parte da energia do plasma é então transferida para excitar e ionizar o analito (SUTTON e CARUSO, 1999). A forma convencional de introdução da amostra no ICP é líquida e um sistema típico de introdução de amostra consiste de um nebulizador (pneumático ou ultrassônico), que forma um aerossol fino, seguido por uma câmara de nebulização que separa as gotas maiores das menores vindas do nebulizador. O aerossol é, então, transportado para o plasma pelo fluxo do gás nebulizador, onde rapidamente sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização. O ICP produz, eficientemente, íons monocarregados que são transportados para o espectrômetro de massas (MS), usando uma interface com bomba de vácuo de múltiplo estágio. Os íons são extraídos do plasma a uma pressão atmosférica para o espectrômetro de massas à baixa pressão através de um cone de amostragem de níquel ou platina que se encontra refrigerado. O orifício deste cone tem aproximadamente 1 mm de diâmetro. Os íons são extraídos do plasma a uma pressão atmosférica para o espectrômetro de massas à baixa pressão através de cones refrigerados, de níquel ou platina, sendo um conhecido como cone de amostragem, cujo orifício mede aproximadamente 1mm e outro conhecido como *skimmer*, cujo orifício mede aproximadamente 0,9mm. Na região de baixa pressão, atrás do cone de amostragem, na qual ocorre expansão do gás, uma fração dos íons passa primeiramente através do *skimmer*, e a maior parte do argônio é bombeada para fora. Os íons são focalizados diretamente no caminho do analisador de massas usando lentes, que são simplesmente eletrodos submetidos a diferentes voltagens. Os íons são então separados no analisador de massas de acordo com sua razão massa/carga. O analisador de massas mais comumente usado é um quadrupolo,

embora a necessidade de analisadores de massas para se conseguir alta resolução tem obrigado os fabricantes de instrumentos a produzirem outros analisadores como o focalizador de setor duplo. Parsons e Barbosa (2007) mostraram que existe uma tendência dos laboratórios clínicos especializados na análise de elementos químicos em fluidos biológicos, para a utilização da técnica de ICP-MS.

Acoplamento CV ICP-MS

O acoplamento da geração química de vapor frio de Hg (CV) com a ICP-MS foi inicialmente descrita por Cristopher (2001) para determinação de Hg em materiais de referência certificados de sangue, sendo utilizado também a diluição isotópica. O método apresentou bons resultados na determinação de Hg nos materiais de referência de sangue porém não foi feito o fracionamento ou a especiação química, apenas determinação do Hg-t.

Wu et al. (2007) também fizeram o acoplamento da geração química de vapor frio de Hg (CV) com a ICP-MS, sendo que os autores propuseram o uso de reagentes como o NaBH_4 para determinação de Hg-t e a L-cisteína para determinação de Hg-i em amostras de água do mar e de tecidos biológicos. As principais vantagens no acoplamento dessa técnica com a ICP-MS é minimização da interferência da matriz uma vez que o vapor gerado é transportado para o sistema de detecção do ICP-MS e a matriz é descartada. Com isso, diminui-se a quantidade de matéria orgânica e sais lançados no equipamento, aumentando, assim, a vida útil dos cones. Porém, tem-se a limitação de haver formação de grandes quantidades de gás H_2 que pode levar a uma instabilidade do plasma.

1.6-Especiação química de mercúrio

A determinação da concentração total de um elemento numa determinada amostra foi muito utilizada para se verificar potencial efeito tóxico ou benéfico desse elemento para a saúde humana. Porém, nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm reconhecido que a quantificação elementar sozinha não é suficiente, pois se verificaram que além da toxicidade, a biodisponibilidade e a mobilidade de um elemento estão diretamente relacionadas com as diferentes espécies químicas presentes nos seres vivos e/ou no ambiente (ROSEN e HIETFTJE, 2004).

Assim, para um completo entendimento da maneira pela qual um determinado elemento afetará os organismos vivos, é necessário determinar as espécies nas quais esses elementos são encontrados e quantificá-las apropriadamente. As análises feitas com essa finalidade são denominadas de análise de especiação ou simplesmente especiação química (ROSEN e HIETFTJE, 2004). Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o termo especiação química se refere à distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema, e análise por especiação química é definida como a atividade analítica de identificação e/ou determinação das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra (TEMPLETON et al., 2000).

Na especiação química, normalmente são empregadas técnicas de separação (geralmente técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida (LC), a cromatografia com fluído supercrítico ou a eletroforese) acopladas à técnicas de detecção de alta sensibilidade, como a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) e a espectrometria de massas com fonte de plasma

acoplado indutivamente (ICP-MS), sendo que, atualmente, esta última tem sido a técnica de escolha para a determinação de elementos em diversos tipos de amostras em concentrações num intervalo de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (SUTTON e CARUSO, 1999). A versatilidade da ICP-MS, em termos de especificidade e sensibilidade, a torna idealmente apropriada para o uso como detector cromatográfico (SUTTON e CARUSO, 1999).

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais utilizadas para separação cromatográfica na especiação química de Hg. Para que seja possível a separação das espécies por GC, é necessário que haja uma conversão delas em derivados alquilados não polares (derivatização). Alguns reagentes têm sido propostos para esse processo (SMAELE et al., 1998; FERNÁNDEZ et al., 2000). O reagente de Grignard foi muito utilizado para esse fim, porém é necessário um meio anidro para que a reação ocorra. Assim, as espécies organometálicas devem ser extraídas e depois complexadas com um reagente que as torne solúvel em solventes não polares e, com isso, introduz-se uma etapa adicional no preparo da amostra, que faz com que aumente o tempo total de análise e, conseqüentemente, dificultando a análise em rotina. Sendo assim, o uso alternativo de organoboratos tem aumentado muito ultimamente devido à reação ocorrer em meio aquoso. O tetraetilborato de sódio (NaBEt_4) é o organoborato mais comum e com maior número de aplicações encontrado na literatura (FERNÁNDEZ et al., 2000). No entanto, ele apresenta uma desvantagem de não distinguir etilmercúrio de mercúrio inorgânico. Outra alternativa seria o uso do tetrapropilborato de sódio (NaBPr_4). Tal reagente também pode ser utilizado no processo de derivatização em meio aquoso, com a vantagem de ser possível a distinção entre Hg-i e EtHg. A desvantagem desse reagente seria o fato de ele ser mais instável e, depois de preparado, deve ser utilizado em até 3 dias,

diferente do NaBEt_4 que é mais estável e pode ser utilizado em até 20 dias após ser preparado (FERNÁNDEZ et al., 2000).

Sánchez et al. (2004) desenvolveram um sistema de especiação de mercúrio em água de mar utilizando o sistema GC-ICP-MS e derivatização por etilação e também por propilação. A extração das amostras era feita através da microextração em fase sólida, sendo monitorado metilmercúrio e mercúrio inorgânico. Os limites de detecção do método foram de 0,11 e 1,6 ng L⁻¹ para MeHg e Hg-i em amostras de água do mar (etilação), respectivamente.

Li et al. (2008) utilizaram o sistema GC-ICP-MS na especiação de mercúrio em amostras de alimentos marinhos, sendo determinados mercúrio inorgânico, metilmercúrio e não sendo detectado etilmercúrio nas amostras analisadas.

Mais recentemente, um método de especiação de mercúrio em amostras biológicas foi proposto por Gibicar et al. (2009) com determinação das espécies por GC-ICP-MS. Os autores monitoraram metilmercúrio e etilmercúrio, sendo utilizada a propilação para derivatização das espécies de mercúrio presentes nas amostras. O método foi também aplicado para especiação de mercúrio em vacinas contendo etilmercúrio.

Nevado et al. (2009) desenvolveram um método de especiação de mercúrio em células do Sistema Nervoso Central expostas a MeHg visando estudos de genotoxicidade. Foi utilizado um preparo de amostras com extração assistida por microondas e derivatização por etilação. Foram quantificados as espécies Hg-i e MeHg, apresentando diferenças nas concentrações das espécies de mercúrio de acordo com o tipo de célula estudada.

Hippler et al. (2009) desenvolveram um método para determinação apenas de MeHg em sangue. Os autores fizeram uma comparação entre GC-MS (Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massas) e GC-ICP-MS. Os limites de detecção dos dois métodos foram próximos a $0,5\mu\text{g L}^{-1}$. Foram analisadas amostras de sangue de pessoas não expostas a mercúrio sendo que os valores de MeHg foram quase sempre menores do que $10\mu\text{g L}^{-1}$.

Comparado com a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida (LC) tem sido atualmente a técnica de escolha na especiação química de Hg devido ao fato de não ser necessários processos de derivatização do analito antes da separação. Outra vantagem do acoplamento da LC à ICP-MS está no fato de as vazões utilizadas na LC serem da ordem de $0,1$ a $1,0\text{mL min}^{-1}$ e, assim, são compatíveis com o sistema de introdução de amostras no ICP e vários nebulizadores podem ser usados para corresponder a esse fluxo. Adicionalmente, a fase móvel da LC que elui da coluna está à pressão atmosférica e se torna idealmente apropriada para o sistema de introdução de amostras da ICP-MS (WANG, 2007).

A versatilidade da ICP-MS em termos de especificidade e sensibilidade a torna idealmente apropriada para o uso como detector cromatográfico. As principais vantagens da ICP-MS sobre outros possíveis métodos de detecção incluem o amplo intervalo dinâmico linear, alta velocidade de análise, capacidade multielementar, espectro simples e habilidade para análises isotópicas (SUTON e CARUSO, 1999; WANG, 2007).

Harrington e Catterick (1997), na tentativa de desenvolver métodos para a determinação de metilmercúrio e mercúrio inorgânico pelo acoplamento da HPLC com ICP-MS, encontraram alguns problemas relacionados ao uso de componentes

de aço inoxidável no sistema da HPLC. Eles observaram a adsorção dos compostos de mercúrio nesses componentes, sendo que a adsorção do cloreto de mercúrio (II) foi mais pronunciada do que metilmercúrio. Os autores também observaram que usando como fase móvel a mistura de brometo de tetrabutilamônio 10mM e metanol 60 %, o tipo da alça de amostragem não exercia efeito na separação dos compostos, mas as duas colunas de aço inoxidável testadas adsorviam os compostos na mesma proporção. Os problemas de adsorção foram reduzidos significativamente com o uso de componentes feitos de outros materiais (polieteretercetona (PEEK), coluna de vidro) e com a inclusão de 2-mercaptoetanol no eluente.

Chiou et al. (2001) combinaram a geração de vapor e a cromatografia líquida com ICP-MS para especiação de mercúrio em amostras de peixes. A separação cromatográfica de mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio foi possível utilizando-se, como fase móvel, uma mistura contendo 2-mercaptoetanol 0,05% v/v e L-cisteína 0,05% m/v (pH = 6,6) fluindo a $0,6\text{ mL min}^{-1}$ e coluna de fase reversa (C_8) de 2,1 mm de diâmetro interno por 250 mm de comprimento. A separação cromatográfica era feita antes da geração de vapor de mercúrio, que utilizava uma solução de NaBH_4 0,02% m/v em NaOH $0,01\text{ mol L}^{-1}$ na saída da coluna. O vapor gerado era então levado ao ICP-MS via nebulizador pneumático.

Hight e Cheng (2006) desenvolveram um método para determinação de metilmercúrio e mercúrio total em peixes de água salgada usando cromatografia líquida de alto desempenho e ICP-MS. Na separação cromatográfica foram utilizadas coluna de fase reversa (C_{18}) e, como fase móvel, solução aquosa de L-cisteína 0,1% m/v + 0,1% m/v L-cisteína.HCl.H₂O fluindo a $1,0\text{ mL min}^{-1}$. Segundo os autores, a forma predominante de mercúrio presentes nos peixes analisados é o

metilmercúrio, sendo que a relação entre metilmercúrio/mercúrio total foi de 0,93 a 0,98.

Lin et al. (2008) desenvolveram um método de especiação de mercúrio em cereais por HPLC-ICP-MS, sendo que monitoravam mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio. A separação cromatográfica era obtida utilizando a solução 0,5% v/v 2-mercaptoetanol e 5% v/v metanol. Após a separação também foi utilizado um sistema de geração de vapor frio de mercúrio com tetrahidroborato de sódio (NaBH_4). O preparo das amostras foi feito com extração assistida por microondas. A desvantagem do sistema está no fato de o preparo de amostras utilizando microondas ser um pouco demorado, quando comparado com outros métodos de especiação por HPLC-ICP-MS.

Um método de especiação de mercúrio em amostras ambientais com extração utilizando ponto nuvem foi desenvolvido por Chen et al. (2009). Os analitos eram complexados com dietilditiocarbamato e a separação das fases para extração foi feita utilizando um surfactante não iônico, o Triton x-114, sendo que ocorria a separação cromatográfica de mercúrio inorgânico e metilmercúrio. Yin et al. (2010) desenvolveram um sistema de especiação de mercúrio em amostras aquosas utilizando o acoplamento da cromatografia líquida com ICP-MS, utilizando extração em fase sólida. Foram determinados mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio, com uso de uma coluna C_{18} .

O acoplamento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com a ICP-MS (HPLC-ICP-MS) foi proposta por diversos autores em estudos de especiação de Hg em amostras biológicas (HIGHT e CHENG, 2006; VALLANT et al., 2007; MENG et al., 2007; SANTOYO et al., 2009). Porém, estes métodos são, em

muitos casos, complexos, com longas corridas cromatográficas e com várias etapas de pré-tratamento das amostras, o que, muitas vezes, leva a erros na quantificação das espécies. Assim sendo, o desenvolvimento de métodos mais simples e rápidos de especiação química de Hg atualmente é muito importante, já que a necessidade de se utilizar a especiação em rotina nos laboratórios clínicos está se tornando cada vez maior.

2-Objetivos:

Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de métodos de fracionamento e de especiação química de mercúrio em sangue e plasma utilizando técnicas acopladas à ICP-MS, para posterior aplicação em amostras de sangue e plasma de indivíduos da população Ribeirinha do Rio Tapajós, Amazônia Brasileira.

2.1-Estudo I:

- ✓ Desenvolvimento de um método simples para determinação de Hg-t e Hg-i (fracionamento) em sangue e plasma (Hg-o pela diferença) através do acoplamento CV ICP-MS com preparo de amostras utilizando TMAH.

2.2-Estudo II:

- ✓ Desenvolvimento de um método de especiação química de Hg em sangue/plasma através do acoplamento HPLC-ICP-MS com um rápido procedimento de preparo da amostra.

2.3- Estudo III:

- ✓ Desenvolvimento de um método de especiação química de Hg em sangue através do acoplamento GC-ICP-MS com extração assistida por microondas.

3. Justificativa

Relevância: Os estudos aqui desenvolvidos se enquadram em uma nova tendência de pesquisas dentro das análises toxicológicas e toxicologia de metais, i.e., desenvolvimento de métodos para fracionamento e especiação química de metais para avaliação tóxica e/ou nutricional.

4- Material e Método

4.1-Estudo I- Fracionamento de mercúrio em sangue e plasma por geração de vapor frio (CV) e acoplamento no Espectrômetro de Massas com Plasma (CV ICP-MS).

4.1.1- Equipamentos e Acessórios:

Para o fracionamento de mercúrio em sangue e plasma foi feito o acoplamento do sistema de geração química de vapor frio (CV) diretamente no ICP-MS. Para isso, utilizou-se um equipamento de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) ELAN DRC II PerkinElmer, Norwalk, CT (EUA) ligado em um computador Dell Pentium 4 com o Software Elan®, Versão 3.4 e impressora Hewlett-Packard Laserjet 4250. Esse equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em uma sala limpa classe “1000”.

Para propulsão dos fluidos para o equipamento foi utilizada uma bomba peristáltica de 8 canais (Ismatec IPC, EUA) juntamente com a bomba peristáltica presente no ICP-MS.

4.1.2-Reagentes, soluções, materiais de referência e limpeza do material.

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®), previamente purificada em sistema de Osmose Reversa (RiOs-DITM da Millipore®); ácido nítrico (Synth 65% v/v) purificado por destilação, empregando-se destilador subboiling de quartzo da Kurner (Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) para eliminação de impurezas; L-cisteína (Fluka, 99,5%,

C₃H₇NO₂S); Triton® X-100 suprapuro (Sigma-Aldrich); ácido etilenodiamino tetra-acético sal dissódico (EDTA, Merck 99%, C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O); amônia 99,999% (PRAXAIR INC., U.S.A.).

A solução redutora foi preparada pela dissolução de NaBH₄ (Sigma-Aldrich, Alemanha) em NaOH (Carlo, Erba, Milan, Itália). A solução de SnCl₂ (Sigma Aldrich, Alemanha) foi preparada através da dissolução do sal em HCl 10%v/v. L-cisteína (Fluka, Japão) e KMnO₄ (Low in Mercury, Sigma-Aldrich, USA) foram preparadas em meio aquoso. Anti-espumante (Antifoam B, Fluka, Buchs, Suíça) foi preparado diluindo-se em meio aquoso no método por CV ICP-MS e utilizado sem diluição no método de comparação CV AAS.

Soluções de 2-mercaptoetanol (Fluka, Alemanha), dicromato de potássio (Fluka, Alemanha) e ouro (PerkinElmer, USA) foram preparadas em meio aquoso e utilizadas para minimizar o efeito de memória de mercúrio.

Amostras de Materiais de Referência de sangue e plasma foram obtidas do *Institut National de Santé Publique Du Quebec (Canadá, Human blood QMEQAS07B03)*, do *Wadsworth Center – New York State Department of Health (USA, Whole blood NYSDOH BE 07-08, NYSDOH BE 07-09, NYSDOH BE 07-10)*.

A análise de baixas concentrações de metais em qualquer matriz requer uma limpeza especial do material que é utilizado no preparo das amostras e armazenamento de soluções. Assim, todos os frascos plásticos utilizados foram colocados em banho de ácido nítrico 15 % v/v por 48 h, enxaguados com água Milli-Q por 5 vezes e secos em câmara de fluxo laminar (classe “100”), onde também são preparados os reagentes, amostras, soluções padrão e brancos. Para o preparo das soluções de calibração utilizou-se soluções estoque de Hg inorgânico (Hg-i) de 10mg L⁻¹ produzidas pela PerkinElmer e padronizadas pelo National Institute of

Standards and Technology (NIST) e solução estoque de Metilmercúrio (Sigma Aldrich, Alemanha) de 10mg L^{-1} .

Para as curvas de calibração preparadas pelo método de ajuste de matriz foram utilizados sangue e plasma de carneiros (sangue e plasma base) pertencentes ao Biotério Central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Encontra-se anexada a cópia da autorização do Comitê de Ética em Pesquisa de Animais para utilização das amostras de sangue e plasma (Protocolo CEP/FCFRP 091873535).

4.1.3-Coleta de sangue de carneiro (sangue e plasma base).

Foram utilizados tubos de coleta de sangue da Becton Dickinson Vacutainer® “livre de metais” de 6 mL (anticoagulante: etilendiamino tetra-acético dipotássico, EDTA), luvas de látex sem pó (EMBRAMAC), agulha Becton Dickinson 1,60x40 (16 G 1,5), algodão e álcool 70°GL para assepsia. A coleta foi realizada por médicos veterinários do Biotério Central da Universidade de São Paulo do campus de Ribeirão Preto por meio de punção da veia jugular de carneiros machos, após assepsia com álcool 70° GL. Cerca de 80 mL de sangue foram coletados duas semanas ou menos antes do experimento. O sangue base foi coletado com o anticoagulante EDTA. Após a coleta, o sangue foi lentamente homogeneizado por no mínimo 10 minutos para evitar coagulação e armazenados a -80°C num freezer Thermo Revco (ULT1386, EUA). Parte do sangue foi centrifugada (Centri-Bio (80-2B)EUA) durante 5 minutos ($1000\times g$) e o plasma foi separado do homogeneizado de hemácias e foi também armazenado a -80°C em um freezer Thermo Revco (ULT1386, EUA).

Tabela 1: Condições operacionais do ICP-MS para fracionamento de Hg em amostras de sangue e plasma.

Parâmetros do sistema de geração de vapor frio de Hg	
CV ICP-MS	
Mercúrio inorgânico	
Concentração de HCl (%v/v)	4,0
L-cisteína (%m/v)	1,1
SnCl ₂ (%m/v)	1,2
Vazão do gás de arraste/L min ⁻¹	0,75
Mercúrio Total	
Concentração de HCl (%v/v)	4,0
Concentração de NaBH ₄ (%m/v)	0,4
Concentração de KMnO ₄ (%m/v)	0,4
Vazão do gás de arraste/L min ⁻¹	0,75
Condições experimentais do ICP-MS	
Potência de Radiofrequência/W	1100
Modo Scan	Peak hopping
Resolução/uma	0,7
Tempo de replicata/s	1
Dwell Time (Tempo de residência do analito para quantificação no MS)	50ms
Sweeps/leitura (número de varreduras feitas pelo MS)	70
Replicatas	3
Isótopo	²⁰² Hg

4.1.4- Fracionamento de mercúrio em sangue por CV AAS (Método Comparativo).

Foi também utilizado um método de determinação de Hg-t e Hg-i proposto por Torres et al. (2009) utilizando CV AAS para comparação com o método proposto de fracionamento de Hg por CV ICP-MS.

Para este método de comparação por CV AAS empregou-se um sistema de geração química de vapor (MHS-15 da Perkin Elmer, CT, EUA) operado em modo batelada acoplado ao espectrômetro de absorção atômica (Analyst 100, PerkinElmer, EUA) equipado com uma lâmpada de catodo oco de mercúrio (PerkinElmer, EUA) e um corretor de fundo de deutério. Esse equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Espectrometria Atômica e de Massas, na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. A representação esquemática do sistema está apresentada na Figura 3. No frasco de reação são adicionados o ácido clorídrico, KMnO_4 (para Hg-t) e a amostra. As seguintes condições de operação foram adotadas: comprimento de onda, 253,7nm; fenda espectral, 0,7nm; corrente, 6,0mA. Para todas as medidas, um tubo de quartzo com comprimento de 165mm e um diâmetro de 12mm posicionados no caminho óptico foi usado, mantido a temperatura ambiente. Argônio com uma pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás carreador para o vapor de mercúrio, a uma pressão de 250 kPa. Neste caso, área de pico foi usada para avaliação do sinal.

Figura 3: Sistema MHS-15 de geração química de vapor com atomizador de quartzo (QTA) para fracionamento de Hg por CV AAS.

4.1.5- Preparo das amostras:

Método para o fracionamento de mercúrio em sangue e plasma por geração de vapor frio de Hg acoplado à espectrometria de absorção atômica (CV AAS).

Para a determinação de Hg-i, uma alíquota de 250 μ L de amostra (sangue ou plasma) foi transferida para um frasco de reação contendo 1mL de solução de HCl 1mol L⁻¹ e 50 μ L de anti-espumante. Para geração do vapor frio de Hg foi adicionado NaBH₄ 1,5%*m/v* (agente redutor) por 5s em linha e foi feito o monitoramento do sinal no Equipamento de AAS por 30s.

Para determinação do Hg-t foi utilizado uma alíquota de 100 μ L de amostra (sangue ou plasma) que foi transferida para um frasco de reação contendo 1mL de HCl 1mol L⁻¹ e 50 μ L de anti-espumante, seguido pela adição de 150 μ L de solução de KMnO₄ 2%*v/v* e esperou-se um tempo de reação de 2 minutos. Para geração do

vapor frio de Hg foi adicionado NaBH_4 3,0% m/v (agente redutor) por 5s em linha e foi feito o monitoramento do sinal no Equipamento de AAS por 30s. A concentração do mercúrio orgânico (Hg-o) foi definida como a diferença entre a concentração do mercúrio total (Hg-t) e o mercúrio inorgânico (Hg-i). A curva de calibração foi preparada diariamente com padrões em meio aquoso com concentrações de 5,0 a $50,0\mu\text{g L}^{-1}$.

Método para o fracionamento de mercúrio em sangue e plasma por geração de vapor frio de Hg utilizado em linha à espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (CV ICP-MS).

Uma alíquota de $500\mu\text{L}$ de amostra (sangue ou plasma) foi transferida para um tubo cônico de 15mL e $500\mu\text{L}$ de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 2,5% m/v foi também adicionado. A mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, o volume foi completado a 10mL com uma solução contendo HCl 2,0% v/v. Soluções padrão com ajuste de matriz (matrix-matching) foram preparadas diariamente através da adição de $500\mu\text{L}$ de sangue base ou plasma base (de origem caprina) e também com adição de soluções intermediárias de padrão de Hg-i e MeHg. As concentrações no sangue base ficaram abaixo do limite de detecção do método para Hg-t ($0,08\mu\text{g L}^{-1}$). A concentração do mercúrio orgânico (Hg-o) foi definida como a diferença entre a concentração do mercúrio total (Hg-t) e o mercúrio inorgânico (Hg-i). A curva de calibração foi preparada diariamente com padrões em meio aquoso com concentrações de 1,0 a $16,0\mu\text{g L}^{-1}$.

4.1.6-Sistema de Injeção em Fluxo com geração de vapor frio de Hg para quantificação por ICP-MS.

O desenho esquemático completo de todo o sistema de geração de vapor frio até que a amostra seja direcionada para o ICP-MS está representado na Figura 4.

Figura 4: Representação do Sistema de Injeção em fluxo com geração de vapor frio de Hg e quantificação por ICP-MS (A=Amostra ou padrão, G= Gás de arraste (Argônio), W= Descarte, L/G= Separador de fases (Líquido/Vapor) R₁= Reagente 1(HCl; vazão 0,76mL/min), R₂= Reagente 2 (KMnO₄/L-Cisteína; vazão 1,2mL/min), R₃= Reagente 3 (NaBH₄/SnCl₂; vazão 1,2mL/min), P₁= Bomba peristáltica do ICP-MS, P₂= Bomba peristáltica Ismatec, W= Descarte (vazão 10mL/min).

Conforme se pode observar na Figura 4 a amostra é injetada pela Bomba Peristáltica 1 (P1) e, em seguida, recebe o Reagente 1 (HCl) para acidificar o meio e depois na segunda confluência a solução recebe o Reagente 2 que pode ser KMnO₄ para determinação de mercúrio total (Hg-t) ou L-cisteína para determinação de mercúrio inorgânico (Hg-i). Na terceira confluência a amostra recebe o Reagente

3 que pode ser NaBH_4 para determinação de Hg-t ou SnCl_2 para Hg-i. Argônio com uma pureza de 99,999% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás carreador para o vapor de mercúrio. Junto com a solução de HCl foi adicionado anti-espumante 10%v/v na proporção de 1mL para cada 50mL de solução ácida utilizada.

Na Figura 5 está apresentada a câmara de separação de fases que é conectada no ICP-MS e foi configurada em nosso Laboratório para facilitar o acoplamento CV ICP-MS.

Figura 5: Representação esquemática do separador de fases (A) e fotografia do mesmo conectado ao ICP-MS (B).

A tubulação do gás argônio foi desconectada do sistema de nebulização original da ICP-MS e conectada na câmara de separação conforme Figura 5. Pode-

se observar também que a amostra líquida após receber todos os reagentes em confluência é direcionada para a câmara de separação de fases (Figura 4), onde a solução líquida presente vai para o descarte e o vapor frio de mercúrio é direcionado para a ICP-MS, para que ocorra a quantificação.

4.1.7- Estudo do Efeito de Memória de Hg

Foi avaliada a possibilidade de diminuição do efeito de memória de Hg através do uso de soluções contendo dicromato de potássio, 2-mercaptoetanol, ouro e uma mistura de 2-mercaptoetanol 0,4%, HCl 2,0% e ouro (1mg L^{-1}). Para isso, foi feita a leitura de uma amostra de sangue e plasma fortificada (Spike) com Hg-i $5\mu\text{g L}^{-1}$ e Metilmercúrio (MeHg) também com concentração $5\mu\text{g L}^{-1}$. Após a leitura da solução foi monitorado o sinal do branco durante 15s para observar se o mesmo retornava à linha de base.

4.2-Estudo II- Especificação química de mercúrio em sangue e plasma por acoplamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ao espectrômetro de massas com plasma (HPLC-ICP-MS).

4.2.1-Equipamentos e acessórios

Todas as determinações foram feitas com ICP-MS Elan DRC II PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA) para determinação de Hg-t e para especificação. Foi feito o acoplamento do ICP-MS com HPLC PerkinElmer modelo L-200, EUA, conectando uma tubulação que liga a saída da coluna cromatográfica com a entrada do nebulizador da ICP-MS de acordo com a Figura 6.

Figura 6: Acoplamento do Sistema HPLC-ICP-MS. A- os 2 equipamentos instalados na Sala Limpa Classe 1000; B- detalhe do acoplamento dos dois equipamentos com a conexão da HPLC na entrada do nebulizador do ICP-MS.

4.2.2-Especiação de Hg por HPLC-ICP-MS

Foi utilizado um HPLC PerkinElmer modelo L-200 LC, EUA, com bomba peristáltica de 6 canais (Rheodyne 9725) com uma coluna de fase reversa (C18, 5 μ m, 150mm x 4mm, Brownlee Columns PerkinElmer, EUA) e uma pré-coluna (*Guard Column*) RP18 (7 μ m, 15x3,2mm, Brownlee columns PerkinElmer, EUA). As amostras foram colocadas em um auto-amostrador automático com um volume de 100 μ L de amostra. Todas as separações foram feitas à temperatura ambiente no modo isocrático. A fase móvel foi constituída por 95% de uma solução contendo mercaptoetanol 0,05%v/v; L-cisteína 0,4%v/v; acetato de amônio 0,06 mol L⁻¹ e 5% de metanol. O efluente da coluna do HPLC foi diretamente conectado no nebulizador (Meinhard) do ICP-MS com um Tubo do tipo *Peek* (1,59mm i.d.) junto a um conector. A obtenção dos dados foi feita pelo software Chromera® que se localiza junto com o

software do ICP-MS (Elan®). A quantificação foi feita pela altura do pico e por calibração externa.

As condições experimentais otimizadas para a ICP-MS e para a HPLC estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições operacionais para especiação de Hg em sangue e plasma por HPLC-ICP-MS.

Condições otimizadas- HPLC	
Coluna	C18 (5µmx 150mmx 4mm)
Pré-coluna (coluna guarda)	RP18 (7µm x 15x3,2mm)
	2-mercaptoetanol 0,05%v/v
Fase móvel	L-cisteína 0,4%m/v
	Acetato de amônio 0,06 mol L ⁻¹
Vazão da fase móvel	1mL min ⁻¹
Volume de amostra injetada	100µL
Modo de determinação	Altura de pico
Condições experimentais- ICP-MS	
Potência de Radiofrequência	1200W
Modo Scan	Peak hopping
Vazão do gás nebulizador	0,58 L min ⁻¹
Resolução	0,7uma
Replicatas	3
Isótopo	²⁰² Hg

4.2.3-Determinações de Hg-t em sangue e plasma

O método utilizado para determinação de mercúrio total em amostras de sangue e plasma foi baseado em um trabalho desenvolvido por Palmer et al. (2006). Assim, amostras de sangue foram diluídas 1+49 (ou plasma 1+19) em um frasco cônico de polipropileno Falcon® de 15mL (Blue MaxTM Jr., Becton Dickinson) com uma solução diluente contendo ácido nítrico bi-destilado 0,5%v/v, Rh 25µg L⁻¹ como padrão interno, Au 1mg L⁻¹ para controlar o efeito de memória de Hg na câmara ciclônica e Triton® x-100 0,005%v/v e analisado por ICP-MS.

4.2.4-Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados são de alto grau analítico e as soluções foram preparadas usando água de alto grau de pureza com resistividade 18,2MΩ cm; obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi bi-destilado em um destilador subboiling de quartzo da Kurner (Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha).

As soluções e amostras foram preparadas no laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, onde se encontram instalados os equipamentos aqui descritos e contendo uma sala Limpa classe 1000. Frascos de plástico e vidrarias foram descontaminados em solução HNO₃ 10%v/v por 48 horas e lavadas 5 vezes com água do sistema Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100 antes do uso.

Foi utilizada uma solução estoque de mercúrio inorgânico de 10mg L⁻¹ da PerkinElmer (PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA). Foi também utilizado uma solução

padrão estoque de 1000mg L^{-1} de metilmercúrio (MeHg) e uma solução padrão estoque de 1000mg L^{-1} de etilmercúrio (EtHg) em meio aquoso (Alfa Aesar). A curva de calibração das espécies de Hg foi preparada diariamente com concentrações de $0,0$ a $20,0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ para o método de HPLC-ICP-MS por diluições das soluções padrão estoque na solução extratora que será descrita posteriormente.

Foram também utilizados no método de especiação: metanol (99,9%v/v) e mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA), L-cisteína (Fluka, Japão), acetato de amônio (99,99%, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA).

Para o método de determinação de Hg-t por ICP-MS o Rh e o Au foram diluídos de soluções padrão estoque de 1000mg L^{-1} (Assurance grade; Spex Certiprep®, EUA). Triton® x-100 produzido pela Sigma-Aldrich Co. (Sigma Ultra Grade, St. Louis, MO, EUA) e diluído com água do sistema Milli-Q. Foi também utilizada uma solução de limpeza contendo triton® x-100 e Au 1mg L^{-1} em ácido clorídrico 2%v/v que foi utilizado entre as leituras de cada amostra.

4.2.5-Preparo das amostras para especiação química de Hg

Inicialmente foram pipetados $250\mu\text{L}$ de amostras de sangue (ou plasma) e foram transferidos para um frasco cônico de propileno de 15mL já contendo $4,75\text{mL}$ de uma solução extratora que consiste numa mistura de HCl 0,1%v/v + L-cisteína 0,05%v/v + 2-mercaptoetanol 0,1%v/v. Em seguida, a solução foi sonicada por 15 minutos em um banho ultrassônico 1400 A (Unique, Brasil). Em seguida a solução foi centrifugada por 5 min ($1000\times g$). Após centrifugação, aspirou-se com uma seringa de 5mL previamente descontaminada o sobrenadante da solução e filtrou-se em um

filtro de 0,20µm Nylon® filters (Millipore, EUA). Foi feita a leitura das amostras em triplicata e o branco também foi preparado da mesma maneira.

Materiais de Referência e amostras de sangue e plasma com espécies de Hg

Foi utilizado um Material de Referência de Sangue *Standard Reference Material* (SRM) 966 *Toxic Metals in Bovine Blood*, do *National Institute of Standards and Technology* (NIST, Gaithersburg, MD, EUA). Foi também utilizado Material de Referência de *Institut National de Santé Publique Du Quebec* (Canadá, *Human blood* QMEQAS07B03 e Serum QMEQAS07S04), do *Wadsworth Center – New York State Department of Health* (USA, *Whole blood* NYSDOH BE 07-08, NYSDOH BE 07-09, NYSDOH BE 07-10). Para validação adicional foi também feita a determinação das espécies de Hg em amostras de indivíduos da Amazônia Brasileira coletadas em um outro projeto de pesquisa envolvendo exposição a Hg em populações ribeirinhas da Amazônia Brasileira, com maiores detalhes da população nos trabalhos de Rodrigues et al. (2009) e Barbosa et al. (2009). As amostras foram obtidas com Termo de Consentimento das pessoas envolvidas no trabalho e estão de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP, sendo que se encontra anexada uma cópia da autorização do Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo CEP/FCFRP nº 113). A coleta de sangue foi feita de acordo com os procedimentos já mencionados no Estudo I do presente trabalho.

4.3-Estudo III: Especiação química de mercúrio em sangue por acoplamento da cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas com plasma (GC-ICP-MS).

Essa etapa do trabalho foi realizada na “Facultad de Ciencias químicas y del Medio ambiente- Universidad de Castilla-La Mancha (España)” em um estágio de doutorado sandwich no ano de 2009.

4.3.1-Equipamentos e acessórios

Todas as determinações foram feitas utilizando um ICP-MS (Thermo Electron Model X Series II, Reino Unido). Foi feito o acoplamento do ICP-MS com GC Varian 3900 (EUA), através de uma interface que sai do GC e conecta diretamente na tocha do equipamento de ICP-MS conforme se observa na Figura 7. Essa interface mantém a temperatura interna constante para que as espécies separadas no cromatógrafo (GC) sejam direcionadas para o ICP-MS, onde ocorre a quantificação. Foi também utilizada uma Coluna cromatográfica Crossbond 100% dimethyl polysiloxane 30metros, 0.53mm id. (Restek, EUA), que se encontra instalada no GC.

Figura 7: Acoplamento do Sistema GC-ICP-MS (Observa-se o ICP-MS, GC e a interface que conecta os dois equipamentos).

4.3.2-Especiação de Hg em sangue por GC-ICP-MS

A saída do GC foi conectada à entrada da tocha do equipamento ICP-MS (interface), sendo a temperatura controlada por uma linha de transferência. As amostras foram injetadas no modo split com um volume de 1 μ L de amostra. O monitoramento do sinal do equipamento é feito utilizando o programa PlasmaLab XSéries. Foi também utilizada uma coluna cromatográfica Crossbond 100% dimethyl polysiloxane 30metros, 0,53mm id. (Restek, USA). As condições experimentais do sistema GC-ICP-MS estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições operacionais para especiação de Hg em sangue por GC-ICP-MS.

Condições otimizadas- GC	
Coluna	Crossbond dimetilpolisiloxano 30m; 0,53mm id
Fase móvel	He
Temperatura de injeção	40°C
Rampa de aquecimento da coluna	40°C/min
Temperatura final da coluna	180°C
Vazão da fase móvel	3.0mL min ⁻¹
Volume de amostra injetada	1µL
Modo de determinação	Área de pico
Condições experimentais- ICP-MS	
Potência de Radiofrequência	1350W
Modo Scan	Peak hopping
Vazão do gás nebulizador	0,58 L min ⁻¹
Resolução	0,7uma
Replicatas	3
Isótopo	²⁰² Hg

4.3.3- Extração das espécies utilizando digestão em sistema fechado

Nessa etapa do trabalho utilizou-se um forno de microondas fechado (Ethos Plus; Milestone, Monroe, CT, Itália) para a extração das espécies de mercúrio. O equipamento realiza o processo de extração de 10 amostras simultaneamente. Utilizou-se frascos digestores de teflon, de alta pureza (TFM- Forma termo-resistente do teflon) com volume máximo de 100mL. Aplicou-se uma potência de 125W por amostra durante 10min até atingir a temperatura de 180°C e em seguida a amostra era irradiada por microondas durante mais 10min a 180°C.

4.3.4-Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados são de alto grau analítico e as soluções foram preparadas usando água de alto grau de pureza com resistividade 18,2 MΩ cm, obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Soluções estoque de mercúrio inorgânico (Hg-i) (1000mg/L) e metilmercúrio (MeHg) (Strem Chemicals, Alemanha) e etilmercúrio (EtHg) (Sigma Aldrich, Alemanha) foram utilizadas, sendo o MeHg e o EtHg preparados através da dissolução do sal em metanol 20% (Merck, Alemanha). Todas as soluções estoque foram preparadas e estocadas em frasco âmbar a -20°C. As soluções padrão para construção da curva analítica foram preparadas diariamente por meio de diluição da solução estoque. Foi também utilizado hexano e isooctano para cromatografia gasosa (Merck, Alemanha) como solventes orgânicos. Todos os reagentes utilizados foram de alto grau analítico. Os gases utilizados no sistema GC-ICP-MS (He e Ar 99,999%) foram obtidos de *Carbueros Metálicos* (Barcelona, Espanha).

Para o processo de extração foi utilizado hidróxido de tetrametilamônio (25%*m/v*) obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para derivatização das espécies de mercúrio foi utilizado tetraetilborato de sódio (NaBEt_4 , 98% de pureza), Strem Chemicals (Bischheim, França) e propilborato de sódio (NaBPr_4) (pureza 98%) que foram obtidos da Galab (Geesthacht, Alemanha).

As soluções e amostras foram preparadas na sala de preparo de amostras do laboratório de química analítica da *Universidad de Castilla-La Mancha*. Frascos de plástico e vidrarias foram descontaminadas em solução HNO_3 10%*v/v* por 48 horas e lavadas 5 vezes com água do sistema Milli-Q e secadas em uma capela de fluxo laminar classe 100 antes do uso.

As curvas de calibração das espécies de Hg foram preparadas diariamente com concentrações de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o método de GC-ICP-MS por diluições das soluções estoque.

Durante todo o processo de especiação também foi utilizada uma solução contendo TI e Rh (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) para monitoramento do número de contagens (controle de qualidade interno do laboratório) e Au 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para reduzir efeitos de memória do mercúrio.

4.3.5-Preparo das amostras para especiação química de Hg por GC-ICP-MS

Inicialmente foram pipetados 300 μL de amostras de sangue e foram transferidos para um frasco de digestão de Teflon de 100mL já contendo 9,7mL de TMAH 20%*v/v*. Em seguida, foi feito o processo de extração assistida por microondas com uma temperatura de 180°C durante 10 minutos (máximo de 10

amostras em cada ciclo do programa). Após esse processo, esperava-se o resfriamento das amostras que eram estocadas em refrigerador 4°C até o início do processo de derivatização.

Em seguida, realizava-se o processo de derivatização das amostras, que ocorreu por etilação e/ou por propilação. Pipetava-se 2mL da solução após extração por microondas em um frasco de vidro de 15mL e acertava-se o pH a 3,9 utilizando ácido acético. Após, adicionava-se 5mL de tampão acetato; 0,5mL de reativo de derivatização 3,0%*m/v* (reativo de etilação ou propilação) e 2,0mL de *n*-hexano. Vedava-se o frasco com uma tampa de plástico e com parafilme e iniciava-se agitação manual por 10 minutos. Após esse processo centrifugavam-se as amostras por 5 minutos a 1000*xg* e em seguida pipetava-se a fase orgânica superior (fase do *n*-hexano) e transferia a amostra (100μL) para um frasco de amostra de 1mL, de onde a amostra será transferida para o cromatógrafo a gás (1μL de amostra). O processo de preparo da amostra está demonstrado na Figura 8.

Figura 8: Esquema representativo do preparo de amostras por microondas para especiação de Hg em sangue por GC-ICP-MS.

Materiais de Referência e amostras de sangue e plasma

Foi utilizado um Material de Referência Certificado de Sangue NIST 966 *Toxic Metals in Bovine Blood*, do *National Institute of Standards and Technology* (NIST, Gaithersburg, MD, EUA). Foi também utilizado Material de Referência de *Institut National de Santé Publique Du Quebec, Canadá* (*Human blood* QMEQAS07B03 e *Serum* QMEQAS07S04), do *Wadsworth Center – New York State Department of Health*, EUA (*Whole blood* NYSDOH BE 07-08, NYSDOH BE 07-09, NYSDOH BE 07-10). Para validação adicional foi também feita a determinação das espécies de Hg em amostras de indivíduos de populações ribeirinhas da Amazônia Brasileira, coletadas em um outro projeto de pesquisa envolvendo exposição a Hg das populações ribeirinhas da Amazônia Brasileira, com maiores detalhes da população nos trabalhos de Rodrigues et al. (2009) e Barbosa et al. (2009). As amostras foram

obtidas com Termo de Consentimento das pessoas envolvidas no trabalho e estão de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP. A coleta de sangue foi feita de acordo com os procedimentos já mencionados no Estudo I do presente trabalho.

5-Resultados e discussão

5.1-Estudo I

Experimentos preliminares com preparo de amostras

A escolha do preparo das amostras em meio alcalino (TMAH) adotado no presente trabalho foi baseada em parte de um trabalho feito por Barbosa et al. (2004) com adaptações. O TMAH promove quebra das ligações dissulfeto das proteínas liberando o analito sem que sua integridade seja perdida (Hg^{2+} ou Hg-i, MeHg, EtHg ou outra espécie).

Assim, 500 μL de amostras de sangue ou plasma foram diluídas inicialmente 1+1 com TMAH 10%v/v e incubadas por 2 horas e então diluídas a 10mL com HCl 2%v/v. A utilização do ácido nessa concentração foi feita levando-se em conta 2 fatores:

- ✓ O vapor frio é favorecido em meio ácido;
- ✓ Essa concentração deve ser limite para ocorrer a reação, sem que ocorram precipitações.

Nesse experimento foi realizado o mesmo preparo de amostra sugerido por Barbosa et al. (2004), porém com 3 horas de incubação das amostras ao invés de 2 horas. Todos os outros experimentos foram feitos utilizando esse protocolo de diluição.

Otimização da vazão do gás de arraste

Para escolha da melhor vazão do gás de arraste, foi feita uma fortificação (Spike) de um sangue base de carneiro com $5\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg-i e analisado pelo método proposto por CV ICP-MS para Hg-t (NaBH_4 0,4%v/v como agente redutor). O gás de nebulização foi desconectado da câmara de nebulização e conectado na câmara de separação líquido-gás conforme mostra a Figura 3 e assim passando a ter a função de gás de arraste. A Figura 9 mostra os resultados para esse estudo. Como se pode observar, uma melhor sensibilidade foi obtida quando se utilizou a vazão de 0,75L/min de argônio tanto para amostras de sangue quanto para amostras de plasma. Em vazões maiores do que 0,75L/min provavelmente pode estar ocorrendo um resfriamento do plasma que pode estar ficando menos energético, o que leva a uma diminuição do processo de ionização do analito de interesse, com posterior queda de sinal. Tal fato poderia ter sido contornado com o aumento da potência de radiofrequência utilizada, porém o uso de altas potências pode levar a um maior desgaste dos cones de amostragem e *Skimmer* (Montasser, 1998). Assim, todos os experimentos do presente trabalho foram feitos com um valor de nebulização de 0,75L/min tanto para amostras de sangue quanto para amostras de plasma.

Figura 9: Otimização da vazão do gás de arraste (argônio) para determinação de Hg-t em sangue e plasma. Sinal proveniente de uma solução de Hg-i $5\mu\text{g L}^{-1}$ em sangue; condições experimentais de acordo com a Tabela 1.

5.1.1-Efeitos de memória do mercúrio

O efeito de memória é um grande problema que pode ocorrer quando se trabalha com vapor frio de mercúrio ou introdução direta da amostra em ICP-MS para determinação de Hg (HARRINGTON et al., 2004). A não correção desse efeito de memória pode levar a problemas, tais como calibração gráfica não linear, longos tempos de limpeza, diminuição da sensibilidade durante o tempo e sinais dependentes da matriz.

O efeito de memória de Hg foi avaliado nesse trabalho no método de quantificação por CV ICP-MS. Para isso, uma amostra de sangue base de carneiro diluída e fortificada com $5\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg-i e $5\mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg e analisado utilizando NaBH_4 (0,4%*m/v*) como agente redutor. Outra amostra de sangue base foi preparada e analisada, porém sem ser fortificada. Um considerável efeito de memória foi observado neste estudo. Para reduzir tal efeito foi avaliada uma combinação de reagentes (HARRINGTON et al., 2004; MENG et al., 2007; PALMER et al., 2006): (i)-solução contendo dicromato de potássio, (ii)2-mercaptoetanol e ouro e (iii)- uma mistura de 2-mercaptoetanol 0,4%; HCl 2,0% e ouro (1mg L^{-1}). A solução contendo 2-mercaptoetanol 0,4%; HCl 2,0% e ouro (1mg L^{-1}) apresentou maior eficiência quando combinado com um tempo de limpeza de 1minuto; ou seja, somente quando se utilizou essa solução pode-se observar que o sinal após a leitura da amostra com Hg-i e MeHg voltava à linha de base. Nesse sentido, nos experimentos seguintes do presente trabalho utilizou-se essa solução na etapa de limpeza, durante um minuto entre cada amostra analisada.

5.1.2-Avaliação da concentração de NaBH_4 para fracionamento de Hg em amostras de sangue e plasma por CV ICP-MS

Alguns trabalhos recentes propuseram a determinação seletiva de Hg-t e Hg-i por CV AAS por meio da variação da concentração de NaBH_4 (SEGADE e BEDICHO, 1999; SEGADE e TYSON, 2003). O Hg-i foi determinado utilizando NaBH_4 0,0001 %*m/v* ao passo que o Hg-t foi determinado utilizando o redutor com concentração 0,75%*m/v* (BERGDAHL et al., 1995). Baseado nestes estudos prévios, no presente trabalho foi também avaliado a possibilidade de se utilizar a variação da

concentração do NaBH_4 para determinação de Hg-i e Hg-t por CV ICP-MS em sangue e plasma. Assim, duas amostras de sangue e duas de plasma base foram fortificadas (Spike) uma com $5\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg-i e outra com $5\mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg. A concentração de NaBH_4 foi variada de 0,0001% a 0,4%*m/v*. No entanto, mesmo em concentrações pequenas de NaBH_4 (0,0001%*m/v*) foram obtidas recuperações de mercúrio (aproximadamente 15%) no sangue e no plasma fortificado com MeHg. Sendo assim, não foi possível a determinação específica de Hg-i baseada somente na variação da concentração do agente redutor. Isso pode ter ocorrido devido à formação de hidreto de metilmercúrio (H-MeHg) no sistema de injeção em fluxo, como foi previamente demonstrado por Park e Do (2008). Por outro lado, foi também observado que a recuperação quantitativa de MeHg em amostras de sangue e plasma não foi possível somente com o uso do NaBH_4 e do HCl. Recuperações da ordem de 80% de metilmercúrio foram obtidas quando se utilizou NaBH_4 0,4%*m/v*. O uso de concentrações mais elevadas de NaBH_4 levou a grandes instabilidades do plasma devido à grande formação de gás hidrogênio e, por isso, não foi levado em consideração os fatores de recuperação para concentrações de NaBH_4 acima de 0,4%*m/v*. A instabilidade se deve a uma interferência no processo de formação do plasma que é dependente de gás argônio e sua pureza (MONTASER, 1998).

O permanganato de potássio é um reagente frequentemente utilizado em métodos de injeção em fluxo por CV AAS devido ao seu poder de oxidar espécies orgânicas de Hg em Hg-i (BARBOSA et al., 2004). Após a oxidação das espécies orgânicas presentes em amostras biológicas para Hg-i, a redução do Hg em linha com NaBH_4 é facilitada podendo assim ser obtidos valores de recuperação próximos de 100%. Barbosa et al. (2004) e Tao et al. (1998) utilizaram KMnO_4 para facilitar a determinação de Hg-t respectivamente em sangue e peixes.

Assim, foi também avaliado o uso de KMnO_4 , no presente estudo, para oxidação de espécies orgânicas de Hg presentes em amostras de sangue e plasma visando a determinação de Hg-t.

5.1.3-Otimização da concentração de KMnO_4 para determinação de Hg-t

O efeito da concentração de KMnO_4 para determinação de Hg-t em sangue e plasma foi avaliado com o presente método. A solução de KMnO_4 foi adicionada em linha (como se observa na Figura 6). Assim, para este estudo, 4 alíquotas (2 de sangue e 2 de plasma) foram diluídas 1+1 com TMAH 10% v/v e foram incubadas por 3 horas conforme descrito anteriormente, e posteriormente o volume foi completado a 10mL com HCl 2% v/v. O sangue e o plasma base foram fortificados (Spike) com Hg para atingir nas amostras uma concentração final de: (i) $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em Hg-i e (ii) $8 \mu\text{g L}^{-1}$ em MeHg. A concentração de NaBH_4 foi fixada em 0,4% m/v.

Foram estudadas concentrações de KMnO_4 de 0,05% a 0,8% m/v, sendo que quando se utilizou concentrações do oxidante até o valor de 0,4% m/v não foram observados resíduos de óxido de manganês hidratado (IV) no separador de líquido-gás. Na concentração de 0,8% m/v foi observada a formação de alguns resíduos, provavelmente de óxido de manganês hidratado (IV), não sendo essa concentração considerada no processo de estudo da escolha da melhor concentração do KMnO_4 . A melhor sensibilidade tanto para Hg-o quanto para Hg-i foi observada utilizando o KMnO_4 na concentração de 0,4% m/v (Figura 10). Assim, quando se associou essa concentração de KMnO_4 com uma concentração de NaBH_4 de 0,4% m/v houve uma recuperação de Hg total próxima a 100% tanto para sangue quanto para plasma.

Após a otimização do método para determinação de Hg-t com o uso de KMnO_4 foi avaliada a determinação seletiva de Hg-i, uma vez que apenas com o uso da variação da concentração de NaBH_4 não foi possível essa determinação seletiva.

Figura 10: Otimização da concentração de KMnO_4 (2 amostras de sangue, sendo uma fortificada (spike) com Hg-i $5\mu\text{g L}^{-1}$ e outra com MeHg $8\mu\text{g L}^{-1}$; NaBH_4 0,4% m/v ; HCl 4,0% v/v , vazão do gás de arraste 0,75L/min).

5.1.4-Otimização da concentração de SnCl_2 e L-cisteína para determinação seletiva de mercúrio inorgânico em amostras de sangue e plasma.

Foi avaliada a determinação seletiva de Hg-i utilizando SnCl_2 ou SnCl_2 em combinação com L-cisteína. Assim, a otimização da concentração de SnCl_2 foi feita com um compromisso entre a sensibilidade e a especificidade para determinação seletiva de Hg-i em sangue e plasma. Foram avaliadas concentrações de SnCl_2 de 0,0 a 1,5%*m/v*. Além da sensibilidade avaliada em cada valor de concentração, foi também avaliada a recuperação de Hg-i e Hg-o com o uso de SnCl_2 nas concentrações mencionadas anteriormente. Para isso, foram preparadas amostras de sangue fortificadas (Spike) com Hg-i $5\mu\text{g L}^{-1}$ e MeHg $8\mu\text{g L}^{-1}$ conforme a descrição do preparo de amostras da Seção do Material e Método do presente estudo. Nessas condições a melhor sensibilidade, com menor valor de recuperação do Hg-o, para determinação de Hg-i foi com o uso de SnCl_2 1,2%*m/v*. Porém, em todas as concentrações estudadas somente com o uso do SnCl_2 não foi possível a determinação específica apenas do Hg-i, sendo que também foi observado a recuperação de Hg-o em sangue fortificado com MeHg.

Assim, foi também estudado o uso da L-cisteína em associação com o SnCl_2 , uma vez que a L-cisteína forma complexos estáveis com o MeHg e, com isso, poderia colaborar com uma melhora na determinação específica apenas do Hg-i em presença de SnCl_2 (TAO et al., 1998). Para tal estudo, duas alíquotas de sangue base foram diluídas 1+1 com TMAH 10%*v/v* e foram incubadas por 3 horas e, em seguida, o volume foi posteriormente completado a 10mL com HCl 2,0%*v/v*. O sangue diluído foi fortificado (Spike) com: (i) $5\mu\text{g L}^{-1}$ em Hg-i e $5\mu\text{g L}^{-1}$ em MeHg (ii). A concentração de SnCl_2 foi fixada em 1,2%*m/v* e os resultados do experimento

estão apresentados na Figura 11. Foi escolhida a concentração de L-cisteína de 1,1%*m/v*, uma vez que nessa concentração somente o Hg-i foi determinado. Houve uma queda de sinal de Hg, já que a L-cisteína promove diminuição do sinal do MeHg mas também leva a uma diminuição do sinal do Hg-i (porém em menor quantidade). Isso pode ser devido a uma pequena formação de complexos de L-cisteína também com Hg-i (TAO et al., 1998). Mesmo com um menor valor de sinal obtido para as espécies de Hg testadas, ainda foi possível a determinação das concentrações de Hg em sangue e plasma já que a ICP-MS apresenta sensibilidade bastante elevada e mesmo utilizando sinais menores ainda é possível conseguir valores de limites de detecção suficientes para quantificação das espécies de mercúrio normalmente encontradas em sangue (SUTON e CARUSO, 1999). Sendo assim, a determinação em linha de Hg-i em amostras de sangue e plasma foi feita com adição de SnCl₂ 1,2%*m/v* e L-cisteína 1,1%*m/v*.

Figura 11: Otimização da concentração de L-cisteína para determinação seletiva de Hg-i em sangue (Amostras de sangue fortificadas (Spike) com MeHg $5\mu\text{g L}^{-1}$, Hg-i $5\mu\text{g L}^{-1}$).

5.1.5-Testes de adição e recuperação de Hg-t e Hg-i em amostras de sangue e plasma

Inicialmente, estudos de adição e recuperação foram feitos com amostras de sangue e plasma base fortificadas (Spike) com diferentes concentrações de Hg-i e Hg-o (na forma de MeHg). Os resultados da recuperação estão apresentados na Tabela 4. Para Hg-t os valores de recuperação obtidos em amostras de sangue

foram de 96 a 106% e para plasma de 98 a 110%. Para Hg-i os valores obtidos para amostras de sangue foram de 98 a 110% e para plasma 100 a 110% também, o que é uma preliminar indicação de uma boa performance do método. Os valores de recuperação estão de acordo com RIBANI et al. (2004) que preconizam recuperações de 70 a 120% para análise de traços em amostras biológicas.

Tabela 4: Testes de adição e recuperação para Hg-t e Hg-i por CV ICP-MS.

Determinação de mercúrio total				
Amostra	Hg-i adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-o adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t obtido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% recuperação
Plasma 1	8	0	8,1 (0,3)	101
Plasma 2	5	5	10,9 (0,5)	109
Plasma 3	0	5	4,9 (0,2)	98
Plasma 4	7	7	15,3 (0,5)	110
Plasma 5	0	7	7,5 (0,2)	107
Sangue 1	0	6	6,16 (0,5)	103
Sangue 2	6	0	5,75 (0,3)	96
Sangue 3	6	6	12,4 (0,1)	103
Sangue 4	2	0	2,1 (0,2)	106
Sangue 5	4	0	3,9 (0,2)	98
Determinação de mercúrio inorgânico				
Amostra	Hg-i adicionado	Hg-o adicionado	Hg-i obtido	% recuperação
Plasma 6	2	0	2,0 (0,1)	100
Plasma 7	7	7	7,2 (0,4)	102
Plasma 8	4	0	4,0 (0,4)	100
Plasma 9	3,6	3,6	3,9 (0,3)	110
Plasma 10	3,6	0	3,7 (0,2)	103
Sangue 6	7	0	7,7 (0,2)	110
Sangue 7	7	7	7,7 (0,5)	110
Sangue 8	2	0	2,0 (0,1)	100

Desvio Padrão em parêntesis (n=3)

5.1.6-Estudos de validação

Foram avaliadas a linearidade, precisão (intra e entre dias), exatidão, limites de detecção e quantificação do método proposto, além dos prévios estudos de recuperação.

Para o estudo de exatidão na determinação de Hg-t e Hg-i em sangue foi utilizado o Material de Referência Certificado NIST 966 Bovine Blood. Foi também feita a determinação de Hg-t e Hg-i em algumas amostras de sangue total e plasma por CV ICP-MS e os valores foram comparados com os obtidos por CV AAS. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação entre os métodos CV AAS e CV ICP-MS na determinação de Hg-t e Hg-i em sangue e plasma.

Amostras	CV ICP-MS		CV AAS	
Plasma	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração
	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	45,7 (3,2)	20,3 (1,2)	46,3 (6,9)	18,2 (1,4)
2	30,1 (2,6)	10,1 (1,0)	26,3 (1,8)	10,2 (3,1)
3	55,0 (4,3)	28,2 (3,1)	47,2 (6,1)	24,2 (1,2)
Sangue	Concentração	Concentração	Concentração	Concentração
Total	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)
4	27,9 (1,8)	12,0 (1,3)	25,9 (1,6)	10,7 (2,1)
5	46,0 (4,5)	10,0 (2,5)	47,6 (3,1)	12,5 (1,6)
6	58,1 (3,3)	20,1 (2,0)	58,9 (4,4)	18,2 (1,2)
7	22,1 (0,9)	5,5(0,2)	21,3(0,9)	4,9(0,5)
NIST 966 ^a	30,2 (0,5)	15,5 (0,4)	-	-

Desvio Padrão em Parêntesis. ^aNIST Standard Reference Material 966 Bovine Blood (Valor alvo para Hg-t=31,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (1,7) e para Hg-i=14,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,93); n=3).

Os valores obtidos para o método proposto estão concordantes com os “valores alvo” presentes no material de referência estudado. Além disso, não houve diferença estatística entre os valores obtidos tanto para Hg-t quanto para Hg-i nas amostras de sangue e plasma analisadas após comparação com os valores obtidos por CV AAS para um intervalo de 95% de confiança aplicando o test t. Os limites de detecção obtidos foram de 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para determinação de Hg-t e Hg-i em amostras de sangue, respectivamente e 0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ para

determinação de Hg-t e Hg-i em amostras de plasma, respectivamente, após a análise de sangue base diluído 1+9 (n=10). O valor do desvio padrão relativo para o estudo da precisão intra-dia foi menor do que 7% para amostra de sangue (SRM NIST 966) e menor do que 6% para amostra de plasma (amostra de plasma de indivíduo exposto a MeHg) tanto para Hg-t quanto para Hg-i (n=5). O valor do desvio padrão relativo para o estudo da precisão entre dias foi menor do que 12% para amostra de sangue (SRM NIST 966) e menor do que 10% para amostra de plasma (amostra de plasma de indivíduo exposto a MeHg) tanto para Hg-t quanto para Hg-i (n=7). Os valores de desvio padrão relativo obtidos estão de acordo com Ribani et al. (2004) que preconizam valores aceitáveis de precisão menores do que 20% para determinações de traços em amostras biológicas. Alguns parâmetros analíticos do método proposto estão apresentados na Tabela 6 e comparados com outros métodos publicados em literatura. Nota-se que o método proposto apresenta melhor frequência analítica e bons valores de limites de detecção quando comparado com os outros métodos apresentados na Tabela 6.

Na Tabela 7 pode-se observar os valores de Hg-t, Hg-i e Hg-o obtidos por CV ICP-MS após análise das amostras de indivíduos expostos a Hg e residentes nas populações ribeirinhas do Rio Tapajós, Pará. Nota-se que a maior porcentagem de Hg-i encontra-se no plasma (em torno de 52%) ao passo que no sangue total a porcentagem de Hg-i é bem menor (em torno de 17%). Isso ocorre devido ao fato de o mercúrio da forma orgânica principalmente ter preferência em se ligar às células vermelhas do sangue. Sempre é importante salientar que esses valores sofrem muitas variações entre indivíduos (LANNACCONE, 2001).

Tabela 6: Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de Hg-t e Hg-i por CV ICP-MS em sangue: comparação com outros métodos de fracionamento de Hg em amostras biológicas encontrados na literatura.

Parâmetros analíticos	Método proposto	Torres et al. (2009)	Albalak et al. (2005)	Chen et al. (1998)	Bergdahl et al. (1995)	Berglung et al. (2005)
Limite de detecção do método ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,08 (Hg-t)	11,5 (Hg-t)	0,35 (Hg-i)	0,14 (Hg-t)	0,06ng g ⁻¹ (Hg-t)	0,09 (Hg-t)
	0,8 (Hg-i)	3,0 (Hg-i)	Não fez Hg-t	0,45 (Hg-i)	0,04ng g ⁻¹ (Hg-i)	0,06 (Hg-i)
Volume de amostra (μL)	500 (Hg-i e Hg-t)	300 (Hg-t)	200 (só para Hg-i)	200 (para Hg-i e Hg-t)	0,5g (para Hg-i e Hg-t)	1000 (para Hg-i e Hg-t)
		750 (Hg-i)				
Método de calibração	Ajuste de matriz	Calibração aquosa	Ajuste de matriz	Ajuste de matriz	Ajuste de Matriz	Calibração aquosa
Procedimento de Preparo da amostra	Tratamento alcalino à temperatura ambiente	Oxidação em batelada (Hg-t) Análise direta (Hg-i)	Digestão em linha	Digestão em linha	Digestão em batelada	Incubação <i>overnight</i> à temperatura ambiente
Frequencia analítica/h	20	6	17	-	-	4

Tabela 7: Resultados obtidos por CV ICP-MS para Hg-t e Hg-i (e por diferença Hg-o) das amostras de indivíduos da população ribeirinha do Rio Tapajós, ambientalmente expostos ao mercúrio.

Sangue	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-o ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%Hg-i/ Hg-t	Plasma	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-o ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%Hg-i/ Hg-t
A	22,75	75,55	98,30	23,15	M	3,56	6,54	10,10	35,21
B	0,42	13,58	14,00	3,03	N	3,45	4,85	8,30	41,51
C	16,41	72,29	88,70	18,50	O	7,45	15,65	23,10	22,86
D	1,73	6,67	8,40	20,65	P	2,07	6,83	8,90	21,82
E	6,14	17,96	24,10	25,47	Q	4,56	9,94	14,50	21,49
F	6,32	22,38	28,70	22,01	R	7,02	23,18	30,20	32,24
G	17,81	83,19	101,00	17,64	S	1,89	8,91	10,80	23,30
H	15,27	52,13	67,40	22,65	T	3,96	6,54	10,50	31,43
I	7,37	28,03	35,40	20,82	U	5,06	7,74	12,80	23,25
J	4,39	20,61	25,00	17,56	V	6,22	5,58	11,80	17,49
K	6,14	30,96	37,10	16,55	W	7,23	12,97	20,20	37,71
L	8,79	27,21	36,00	24,42	X	11,06	10,94	22,00	39,51
Média geral	8,34	34,71	43,05	17,78	Z	4,95	10,51	15,47	52,75

Cabe ressaltar que os resultados referentes ao Estudo I do presente trabalho foram publicados na Revista *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *JAAS* (RODRIGUES et al., 2009b), conforme cópia anexada.

5-Resultados e discussão:

5.2-Estudo II

Experimentos preliminares

Diferentes procedimentos têm sido propostos para extração de espécies de mercúrio em amostras biológicas por HPLC-ICP-MS (CHIOU et al., 2001; MORTON et al., 2002) ou por GC-ICP-MS (GIBICAR et al., 2007; BAXTER et al., 2007). Os procedimentos de extração são feitos geralmente em meio ácido (RAHMAN et al., 2009; CHIOU et al., 2001) ou em meio básico (GIBICAR et al., 2007). No entanto, nenhum desses métodos é proposto para análise de amostras de sangue para especiação utilizando por HPLC-ICP-MS. No acoplamento LC-ICP-MS, é muito importante que se desenvolva uma metodologia de extração no qual a solução tenha um pH final compatível com a introdução da amostra em uma coluna de fase reversa. Cabe também ressaltar que tal solução extratora não pode ser capaz de promover transformações de espécies durante o preparo da amostra (LIANG e LAZOFF, 1999; QVARNSTROM e FRECH, 2002).

Procedimentos alternativos de extração de espécies de Hg visando a especiação química geralmente possuem reagentes contendo grupos tiol, como o mercaptoetanol (CHIOU et al., 2001), L-cisteína (CHIOU et al., 2001) ou tiouréia (KRISHANA et al., 2005). Esses procedimentos podem estar associados com o uso de energia de microondas (POINT et al., 2007). O método de extração avaliado no presente trabalho foi baseado em um método previamente descrito por Chiou et al. (2001) para especiação de Hg em amostras de peixes. Porém, foram feitas algumas modificações a fim de otimizar e acelerar o processo de extração. Em primeiro lugar

utilizou-se banho ultrassônico ao invés de energia por microondas. Em segundo lugar foi acrescentado HCl 0,10%v/v na solução extratora com o objetivo de acelerar a extração em meio ultrassônico, sem que tivesse grandes mudanças no pH. A utilização de um banho ultrassônico faz com que o método se torne mais simples do que com o uso de energia microondas.

5.2.1-Avaliação do tempo de sonicação no processo de extração

Foi feito um estudo de avaliação do tempo de sonicação necessário para extração quantitativa das espécies de Hg. Para isso, foi utilizada uma solução extratora contendo HCl 0,10%v/v + L-cisteína 0,05%v/v + mercaptoetanol 0,10%v/v em diferentes tempos de sonicação. Para este estudo, foi utilizado um material de referência certificado de sangue (SRM NIST 966). Os valores para a porcentagem de extração das espécies de Hg em sangue estão apresentados na Figura 12. Pode-se observar que o tempo de 15 minutos é suficiente para se ter aproximadamente 100% de extração de MeHg e Hg-i. Nota-se que no tempo de sonicação de 50 minutos há uma diminuição na quantidade extraída das espécies que pode ser devido ao aquecimento do próprio banho de ultrassom acima de 20min, que pode ter levado a uma perda do analito por volatilização. Assim, todas as determinações das espécies de Hg nas amostras de sangue e plasma do presente trabalho foram realizadas com um tempo de sonicação de 15 minutos. Uma vez que conseguimos 100% de extração não foi necessário o ajuste de matriz para o preparo da curva de calibração e a calibração foi então sempre feita em meio aquoso.

Figura 12: Estudo do tempo de sonicação na extração das espécies de Hg; porcentagem de extração de espécies de Hg presentes no material de referência certificado NIST 966 (Condições experimentais de acordo com a Tabela 2).

5.2.2-Otimização das condições de operação do HPLC

Após a otimização do processo de extração das espécies de Hg, foi realizado um estudo de otimização da composição da fase móvel. Chiou et al. (2001) utilizaram mercaptoetanol e L-cisteína no estudo de especiação de Hg por HPLC-ICP-MS em amostras de peixes, ao passo que Morton et al., (2002) usaram metanol, mercaptoetanol e acetato de amônio na especiação de Hg em amostras de cabelos, e, por outro lado, uma mistura de L-cisteína, piridina e metanol foi utilizada por

Vallant et al. (2007) na especiação de Hg também em amostras de cabelo. Foram feitos experimentos preliminares que demonstraram resultados bastante promissores em relação ao tempo de separação, seletividade, resolução e sensibilidade com o uso de uma fase móvel contendo uma mistura de mercaptoetanol, L-cisteína, acetato de amônio e metanol. Observou-se que com o aumento da concentração de mercaptoetanol houve aumento do tempo de retenção das espécies de Hg (MeHg, EtHg e Hg-i). Essa mesma tendência foi observada por Chiou et al. (2001). Assim, a concentração de mercaptoetanol foi fixada em 0,05%v/v tendo um compromisso entre seletividade e tempo de análise. A concentração de acetato de amônio foi também fixada em 0,06 mol L⁻¹. Tal concentração é suficiente para manter o pH da fase móvel com valor de 6,7. Por outro lado, foi avaliada a variação da concentração do metanol na fase móvel. Para esse estudo foram fixadas as concentrações de acetato de amônio, L-cisteína e mercaptoetanol em 0,06 mol L⁻¹; 0,05%v/v e 0,05%v/v, respectivamente. Foram estudadas as concentrações de metanol de 0 a 5%v/v. Foi observado um considerável aumento da sensibilidade das espécies de Hg com o aumento da concentração de metanol. O aumento do sinal pode ser explicado devido ao mecanismo de transferência de carga do carbocátion formado (C⁺) para o átomo do analito, melhorando a ionização ou ao aumento na porcentagem de amostra nebulizada (HU et al., 2004). Não foram avaliadas concentrações de metanol com valores maiores do que 5%v/v uma vez que podem levar a instabilidades do plasma, além de aumentar a quantidade de resíduos de carbono nos cones. Assim, a concentração de metanol na fase móvel foi fixada em 5%v/v para os próximos estudos.

Posteriormente, foi feita a otimização da concentração de L-cisteína na fase móvel. A separação das espécies de Hg pode ser devido ao complexo cisteína-mercúrio formado e sua interação com as cadeias poliméricas da coluna de fase reversa C₁₈. Para o estudo de otimização da concentração da L-cisteína foram então fixadas as concentrações do mercaptoetanol, acetato de amônio e metanol em 0,05%v/v; 0,06mol L⁻¹ e 5%v/v, respectivamente. Foram feitos estudos com concentrações de L-cisteína variando de 0,05 a 0,4%*m/v*. Foi observado que com o aumento da concentração da L-cisteína houve diminuição do tempo de retenção das três espécies de Hg (Hg-i, MeHg, EtHg) e aumento da sensibilidade para todas as espécies. Quando se utilizou uma concentração de L-cisteína de 0,4%*m/v* houve uma separação das 3 espécies de Hg em menos de 8 minutos de corrida cromatográfica ao passo que quando havia utilizado a concentração de L-cisteína de 0,05%*m/v* a separação das 3 espécies ocorria em 35 minutos de corrida cromatográfica (Figura 13).

Figura 13: Perfil cromatográfico demonstrando alteração do tempo de retenção das espécies de Hg devido otimização da concentração da L-cisteína na especiação de Hg por HPLC-ICP-MS nas concentrações de (a) 0,05% m/v e (b) 0,4% m/v, utilizando padrão de Hg-i, MeHg e EtHg de $20\mu\text{g L}^{-1}$ para cada espécie.

Assim, a fase móvel com concentrações otimizadas apresentou a seguinte composição: L-cisteína 0,4%*m/v*; mercaptoetanol 0,05%*v/v*, acetato de amônio 0,06 mol L⁻¹ e metanol 5%*v/v*.

5.2.3-Estudos de validação

No presente trabalho foi utilizado o Material de Referência certificado de sangue *NIST 966*, além de outros Materiais de Referência de sangue provenientes do *Institut National de Santé Publique Du Quebec* (Canadá, *Human blood* QMEQAS07B03 e Material de Plasma *Human Serum* QMEQAS07S04), do *Wadsworth Center – New York State Department of Health (USA, Whole blood* NYSDOH BE 07-08, NYSDOH BE 07-09, NYSDOH BE 07-10). Os valores obtidos para os Materiais de Referência estão presentes na Tabela 8. Como pode ser observado na Tabela 8 não houve diferença estatística entre os valores obtidos com o método proposto e os “valores alvo” fornecidos pelos Materiais de Referência de sangue e pelo Material de Referência de soro, para um intervalo de 95% de confiança. Pode-se observar também que apenas o SRM NIST 966 possui valores de Hg-t e Hg-i, e na verdade é o único material de referência de sangue comercial do mundo que contém os valores estabelecidos para Hg-i e Hg-t. Quanto ao plasma não existe comercialmente um material de referência com valores de formas orgânicas ou inorgânicas do Hg. Por isso, utilizou-se o Material de Referência de soro sanguíneo contendo valores de Hg-t, sendo que após a análise do material realizou-se a soma das concentrações das espécies para obtenção do valor do Hg-t.

Os limites de detecção do método proposto (valor calculado como sendo 3 vezes o desvio padrão do branco, dividido pelo coeficiente angular da curva analítica e multiplicado pelo fator de diluição do método) foi de $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ e $0,25\mu\text{g L}^{-1}$ para metilmercúrio e mercúrio inorgânico, respectivamente e os limites de quantificação foram $0,33$ e $0,83\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O cromatograma das três curvas de calibração (das 3 espécies de Hg) estão apresentadas na Figura 14, juntamente com o coeficiente de correlação linear e equação da reta para quantificação.

Foi também feito o estudo de precisão intra dia ($n=5$) e para isso foram feitas determinações de Hg-i e MeHg no SRM NIST 966, sendo o valor do desvio padrão relativo menor do que 7% para as duas espécies nas amostras de sangue. Da mesma maneira, foi feito um estudo de precisão entre dias ($n=7$) sendo feitas determinações de Hg-i e MeHg em dias diferentes sendo o desvio padrão relativo menor do que 12% nas amostras de sangue. Esses valores estão de acordo com os recomendados por Ribani et al. (2004) que demonstraram que os valores de desvio padrão relativo para análise de traços em amostras biológicas deve ser inferior a 20% nos estudos de precisão.

Figura 14: Cromatograma representativo da curva de calibração de cada espécie de Hg (Coeficientes de correlação Linear: Hg-i $R=0,9994$; MeHg: $R=0,9999$; EtHg: $R=0,9994$). Condições experimentais de acordo com a Tabela 2.

5.2.4-Aplicação do método de especiação de Hg em amostras de sangue coletadas de populações Ribeirinhas da Amazônia Brasileira

Além da análise dos materiais de referência acima citados, foi também feita a especiação de Hg em sangue de indivíduos ambientalmente expostos a mercúrio e

os resultados comparados com método de injeção direta de amostras em ICP-MS para determinação de Hg-t (PALMER et al., 2006). Os valores estão apresentados na Tabela 9. Os valores obtidos pela soma das espécies de Hg quantificadas pelo método proposto não apresentaram diferença estatística, para 95% de intervalo de confiança, com os valores obtidos pelo método de Palmer et al. (2006). A Figura 15 apresenta um cromatograma contendo padrões das 3 espécies de Hg (15-B) e também uma amostra de um indivíduo da população Ribeirinha da Amazônia ambientalmente exposto a mercúrio (15-A).

Figura 15: Cromatograma apresentando a separação das 3 espécies em: B padrões contendo 10 μ g L⁻¹ de cada espécie; A- sangue humano de indivíduo exposto ao Hg; Condições da análise vide Tabela 2.

Pode-se observar também que em todas as amostras analisadas a maior parte do Hg está na forma de MeHg, ficando apenas uma pequena porcentagem (aproximadamente 8 a 15% do Hg) na forma de Hg-i.

Tabela 9: Especificação de mercúrio em amostras de sangue e plasma de populações ribeirinhas da Amazônia Brasileira (Pará) expostas ambientalmente ao mercúrio (Média (Desvio Padrão), n=3, ND=Não detectado).

Amostra	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MeHg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EtHg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t, Soma das espécies ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t ICP-MS (Palmer et al., 2006) ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Sangue					
1	6,40 (1,10)	70,7 (1,60)	ND	77,10 (2,70)	76,80 (1,90)
2	5,00 (0,20)	47,3 (0,10)	ND	52,40 (0,30)	52,90 (1,70)
3	5,00 (0,30)	59,1 (0,20)	ND	64,10 (0,50)	66,00 (1,80)
4	6,70 (1,10)	85,1 (0,70)	ND	91,80 (1,80)	103,30 (2,00)
5	4,80 (0,60)	83,1 (0,20)	ND	88,00 (0,80)	86,00 (1,00)
6	5,80 (0,80)	33,2 (1,40)	ND	39,00 (2,20)	39,80 (1,60)
7	5,80 (1,10)	53,1 (1,70)	ND	59,00 (2,80)	58,80 (1,80)
8	4,20 (0,20)	24,5 (0,60)	ND	28,70 (0,80)	28,20 (0,50)
9	2,00 (0,10)	20,3 (0,40)	ND	22,30 (0,50)	22,00 (0,20)
10	2,30 (0,10)	23,2 (1,40)	ND	25,50 (1,50)	24,10 (1,40)
Plasma					
21	21,84 (1,10)	9,36 (0,47)	ND	32,20 (1,57)	30,20 (1,10)
22	7,55 (0,53)	5,25 (0,57)	ND	12,80 (1,10)	13,10 (0,90)
23	9,90 (0,79)	6,40 (0,51)	ND	16,30 (1,30)	15,49 (1,10)
24	6,06 (0,41)	4,04 (0,32)	ND	10,10 (0,73)	9,70 (0,60)

5.2.5-Estabilidade das amostras de sangue após coleta para especificação de Hg

Foram coletadas amostras de sangue (n=10) de comunidades ribeirinhas expostas ao Hg, analisadas e depois estocadas no Freezer a -80 °C durante 6 meses após a primeira análise. Após 6 meses as amostras foram re-analisadas, sendo que não houve diferença estatística para 95% de intervalo de confiança entre os valores obtidos antes e após o tempo de congelamento.

5.2.6-Estabilidade das espécies de mercúrio depois da extração

Para verificar a estabilidade das espécies de Hg na solução extratora realizou-se um estudo de estabilidade das espécies à temperatura ambiente após a extração. Para esse experimento utilizou-se uma amostra de sangue humano contendo Hg-i e MeHg, que foi dividido em 5 diferentes frações de 250µL. Para cada fração, foi feito todo o processo de extração como foi descrito anteriormente e armazenou-se o extraído em temperatura ambiente. A análise de cada fração foi feita em tempos diferentes: Na primeira hora após extração (T_0), 3 horas após extração (T_1), 8 horas após extração (T_2), 24 horas após extração (T_3) e 4 dias após (T_4). Foram quantificadas as 2 espécies presentes (Hg-i e MeHg), sendo que os valores não foram diferentes mesmo após 4 dias de extração para um intervalo de 95% de confiança. Assim, pode-se fazer a extração dessas 2 espécies e armazenar o extraído até 4 dias antes da quantificação.

Como não se observou presença de EtHg em nenhuma amostra de sangue analisada, foi feita a fortificação (Spike) dessa amostra de sangue para se obter concentração final igual a $10\mu\text{g L}^{-1}$ e também se promoveu o fracionamento da

mesma em partes. Foi feita a extração (conforme descrito no método proposto) da fração da amostra imediatamente após a fortificação e também após incubação *overnight*, sendo que na amostra que foi feita a extração após a fortificação a recuperação de EtHg foi inferior a 30%, ao passo que na amostra com incubação *overnight* a recuperação de EtHg foi praticamente zero. Observou-se também que houve um aumento de Hg-i proporcional à perda do EtHg (99%) e uma pequena formação de MeHg (1%), sugerindo que o EtHg é convertido a Hg-i, principalmente, no sangue. Foi também feito todo o procedimento de extração de um padrão de $10\mu\text{g L}^{-1}$ conforme método proposto para verificar se a solução extratora, sem sangue ou plasma, poderia estar promovendo a conversão de EtHg a Hg-i e MeHg, porém observou-se que houve 100% de recuperação de EtHg, o que demonstra que a solução extratora não alterou o etilmercúrio, mas provavelmente algum componente do sangue por um mecanismo ainda não conhecido.

Os resultados referentes ao Estudo II do presente trabalho foram publicados na revista *Talanta* (RODRIGUES et al., 2010), conforme cópia anexada.

5- Resultados e discussão

5.3-Estudo III

5.3.1- Otimização do preparo da amostra

A Etapa do preparo da amostra é de suma importância na especiação química em geral. É preciso que haja uma eficiente solubilização das espécies de mercúrio sem que haja possíveis conversões/inter-conversões das espécies.

Assim, nesta etapa do trabalho foi feito o preparo da amostra utilizando extração assistida por microondas. Como líquido extrator utilizou-se uma solução de TMAH 20%v/v. Esse reagente tem sido utilizado como solubilizador de tecidos de amostras biológicas para análise de diferentes elementos (TSENG et al., 1997; CABAÑERO et al., 2002; NEVADO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; BATISTA et al., 2009) e também para determinação de mercúrio total e inorgânico em sangue como foi proposto por Rodrigues et al., 2009a (Etapa 1 do presente trabalho). A extração de espécies de mercúrio assistida por microondas em amostras de sangue foi proposta por Gibicar et al. (2009) e Hippler et al. (2009) para posterior quantificação por GC-ICP-MS, porém são metodologias com tempo de preparo de amostra muito longo e que dificultaria a aplicação em rotina.

Sendo assim, foram feitos experimentos preliminares baseados principalmente nas condições de extração por microondas e utilizando TMAH como extrator de acordo com Nevado et al. (2006). Para isso foi avaliada a quantidade de amostra utilizada para que se obtenha boa recuperação das espécies, sem que as mesmas percam sua integridade ou que haja possíveis conversões. Foram então

testados volumes de 0,1 a 0,8mL de amostra de sangue de carneiro fortificadas (Spike) com MeHg $50\mu\text{g L}^{-1}$ e Hg-i $20\mu\text{g L}^{-1}$ nos frascos digestores do microondas e o volume completado a 10mL para uma concentração final de TMAH de 20%v/v. Foi feita a irradiação por microondas por 10min a 180°C após ter sido previamente realizada uma rampa de aquecimento até 180°C durante 10min.

A Tabela 10 apresenta os valores de recuperação para o estudo realizado. Como pode ser observado, recuperações quantitativas (maior do que 85%) associadas com boa precisão foram obtidas com volume de até 0,3mL. Utilizou-se o volume de 0,3mL para os próximos experimentos.

Tabela 10: Efeito da quantidade de amostra (sangue) na extração de espécies de Hg por microondas para especiação por GC-ICP-MS.

Volume de amostra (mL)	% Recuperação MeHg	SD	% Recuperação Hg-i	SD
0,1	94,9	3,0	96,6	2,0
0,3	100,3	2,0	97,4	2,0
0,4	86,3	5,0	73,7	5,0
0,5	61,8	10,0	60,0	11,0
0,8	70,3	6,9	72,1	7,5

SD= Desvio Padrão, n=3

Foi também avaliada a possível influência da matriz na quantificação das espécies de mercúrio e para isso foi construída uma curva analítica utilizando sangue de carneiro (ajuste de matriz) e uma curva analítica sem sangue adicionado. Foram feitas concentrações de 1,0 a $25,0\mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg e Hg-i. A Tabela 11 apresenta os valores obtidos para esse experimento. Não houve diferença estatística entre os coeficientes angulares das curvas quando comparamos com e sem ajuste

de matriz para 95% de confiança (Teste estatístico de comparação de coeficientes angulares de curvas).

Tabela 11: Estudo do efeito da matriz (sangue) na especiação de Hg por GC-ICP-MS.

Espécies	MeHg	Hg-i
Coeficiente angular com ajuste de matriz (contagens/ $\mu\text{g L}^{-1}$)	159813	154069
Coeficiente de correlação linear com ajuste de matriz	0,9998	0,9994
Coeficiente angular sem ajuste de matriz (contagens/ $\mu\text{g L}^{-1}$)	159439	154783
Coeficiente de correlação linear sem ajuste de matriz	0,9984	0,9999

O processo de derivatização (etilação ou propilação) foi realizado de acordo com o preparo da amostra demonstrado anteriormente na Figura 8. Com isso, foram obtidas as formas derivatizadas das espécies de mercúrio, sendo o Hg-i etilado (Et_2Hg), o Hg-i propilado (Prop_2Hg), o MeHg etilado (Et-MeHg), o MeHg propilado (Prop-MeHg) e o EtHg propilado (Prop-EtHg).

Pode-se observar na Figura 16 os cromatogramas de espécies de mercúrio (padrão) obtidas por etilação (a) e por propilação (b). Em ambos os casos a separação ocorre em menos de 3 minutos. Conforme foi descrito anteriormente não é possível fazer a determinação de EtHg utilizando a derivatização por etilação.

Observa-se também que o tempo de retenção das espécies derivatizadas aumenta com o aumento da massa molecular dos compostos. Tal fato ocorre porque

quando se tem uma maior massa molecular consequentemente necessita-se de uma maior temperatura da coluna para volatilizar e promover a separação cromatográfica (Skoog et al., 2002). No caso da etilação, a massa molecular do Et_2Hg é maior do que a do Et-MeHg e por isso demora mais tempo para ser eluído pela coluna. Já na propilação Prop_2Hg tem maior massa molecular do que o Prop-EtHg, que por sua vez tem maior massa molecular do que o prop-MeHg.

Figura 16: Cromatograma de espécies de mercúrio obtido após derivatização por etilação (a) e propilação (b) e quantificação por GC-ICP-MS; padrões de MeHg, EtHg e Hg-i 5 µg L⁻¹.

5.3.2- Figuras de Mérito:

A Tabela 12 apresenta os valores de limite de detecção (LOD) e outras figuras de mérito. O cálculo do LOD foi feito de acordo com a linha de base, sendo igual à concentração equivalente a uma altura de 3 vezes o valor médio da altura do ruído (background). O valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição do método (0,3mL de amostra para 10mL de solução extratora).

Tabela 12: Figuras de mérito do método GC-ICP-MS por etilação e propilação. Precisão baseada em 5 leituras

Figuras de mérito	Etilação		Propilação		
	MeHg	Hg-i	MeHg	Hg-i	EtHg
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,23	0,19	0,25	0,22	0,20
Precisão intra-dia (%)					
Precisão entre dias (%)	7,21	7,82	6,92	8,16	12,2
Coeficiente de Correlação Linear (R)	0,9996	0,9993	0,9999	0,9998	0,9993
Tempo de Retenção (min)	1,2	1,8	1,6	2,6	2,3

Os valores de LOD apresentados são suficientes para garantir a especiação de Hg nas amostras de sangue uma vez que as concentrações de Hg em geral estão bem acima desses valores de LOD (FILLION et al., 2006). O método também

apresenta boa precisão visto o desvio padrão relativo (RSD) estar abaixo de 20% para todas as espécies (RIBANI et al., 2004).

Os valores de coeficiente de correlação linear estão próximo de 1 e acima de 0,98 (RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2010) demonstrando a boa linearidade do método.

Foram também feitos estudos de exatidão do método proposto e para isso foi utilizado Material de Referência certificado NIST 966. A Figura 17 apresenta os cromatogramas obtidos na especiação de mercúrio utilizando o preparo de amostras com microondas e derivatização por etilação (a) e por propilação (b).

Figura 17: Especificação de mercúrio no material de referência certificado NIST 966 por GC-ICP-MS, extração por microondas e derivatização por etilação (a) e propilação (b).

Os valores obtidos para o Material de Referência certificado NIST 966, de sangue, assim como outro material de referência NYS 07-06 (com valor certificado apenas de Hg-t), também de sangue, e o material de referência 07S-04, de soro, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Concentrações obtidas do Material de Referência certificado NIST 966 , sangue, material de referência NYS 07-06, também de sangue, e o material de referência de soro, 07S-04. Média (Desvio padrão); n=3; ND=Não detectado.

Material	Method	MeHg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EtHg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	T-Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NIST 966	<i>Valores alvo</i>	16,40 (1,40)	14,87 (0,93)	-	31,40 (1,70)
	Eth-GC-ICP-MS	16,70 (1,20)	14,60 (1,30)	-	31,3 (2,5)
	Prop-GC-ICP-MS	15,90 (1,20)	14,90 (1,00)	ND	30,8 (2,3)
	HPLC-ICP-MS*	16,50 (0,50)	14,80 (0,40)	ND	31,3 (0,9)
NYS 0706	<i>Valores alvo</i>	-	-	-	22,5-41,9
	*Eth-GC-ICP-MS	14,80 (1,10)	23,70 (1,90)	-	34,50 (3,00)
	**Prop-GC-ICP-MS	16,70 (1,20)	22,20 (1,80)	ND	38,90 (3,00)
	HPLC-ICP-MS	14,40 (1,40)	25,50 (2,40)	ND	39,90 (3,80)
07S-04	<i>Valores alvo</i>				18,6-27,0
	Eth-GC-ICP-MS	0,40 (0,01)	22,53 (0,76)	-	22,93 (0,41)
	Prop-GC-ICP-MS	0,20 (0,01)	24,61 (0,95)	ND	24,81 (0,96)
	HPLC-ICP-MS	0,50 (0,08)	26,30 (0,30)	ND	26,80 (0,38)

*Eth-GC-ICP-MS- Especificação GC-ICP-MS com derivatização por Etilação

**Prop-GC-ICP-MS- Especificação GC-ICP-MS com derivatização por Propilação

Observa-se que realizou-se uma comparação entre os valores obtidos pela especiação GC-ICP-MS utilizando derivatização por etilação (Eth-GC-ICP-MS) e por propilação (Prop-GC-ICP-MS), assim como os valores obtidos pela especiação por HPLC-ICP-MS. Os valores obtidos para os materiais de referência tanto por etilação quanto por propilação estão concordantes com os valores alvo especificados pelo material, assim como pelo método HPLC-ICP-MS proposto por Rodrigues et al., 2010 (Estudo II do presente trabalho), não havendo diferença estatística entre eles para 95% de confiança.

Foi realizada a análise do Material de Referência certificado NIST 966 em diferentes dias para avaliação da performance entre dias do método (Precisão entre dias). Observa-se na Figura 18 que o método apresenta uma boa reprodutibilidade não havendo diferença estatística entre os valores obtidos e os valores alvo reportados pelo material em todos os dias analisados.

Figura 18: Precisão entre dias, representada pela variação das concentrações das espécies de mercúrio em sangue (Material de referência certificado NIST 966), sendo o intervalo de confiança do material de referência representado pelas linhas pontilhadas. Hg-t representado pela soma das espécies.

Para que fosse feita uma validação adicional foram quantificadas amostras de sangue de indivíduos das populações Ribeirinhas da Amazônia Brasileira, ambientalmente expostos ao mercúrio, sendo os valores apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Especificação química em amostras de sangue de indivíduos das populações Ribeirinhas da Amazônia Brasileira obtida por GC-ICP-MS (Concentração (Desvio Padrão), n=3).

Amostras	MeHg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg-t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MeHg (%)
85	79,50 (9,80)	6,00 (1,10)	85,60 (11,00)	93,00
301	79,60 (4,20)	5,30 (0,70)	84,90 (4,90)	93,80
303	19,60 (0,40)	1,50 (0,30)	21,20 (0,70)	92,80
304	68,10 (2,50)	6,20 (0,50)	74,30 (3,00)	91,70
306	31,50 (3,80)	3,40 (0,60)	34,90 (4,40)	90,20
307	45,70 (2,50)	5,80 (0,40)	51,60 (2,90)	88,70
312	56,60 (4,10)	4,10 (0,80)	60,70 (7,10)	93,20
313	48,70 (4,30)	5,30 (0,30)	53,90 (4,60)	90,20
314	19,90 (2,60)	2,90 (0,30)	22,80 (2,90)	87,20
315	74,20 (2,30)	5,50 (1,10)	79,70 (3,50)	93,10
320	24,00 (1,40)	3,80 (0,40)	27,80 (1,70)	86,40
277	69,70 (2,30)	3,00 (0,20)	72,70 (2,60)	95,90
281	34,90 (1,50)	4,00 (0,60)	38,90 (2,10)	89,70
285	42,40 (1,90)	2,10 (0,50)	44,50 (2,40)	95,20
288	72,70 (1,00)	8,70 (0,40)	81,30 (1,30)	89,30
289	43,80 (0,50)	1,60 (0,30)	45,30 (0,80)	96,50
290	36,80 (0,30)	3,90 (0,60)	40,70 (0,90)	90,40
293	55,20 (2,50)	3,40 (0,70)	58,60 (3,30)	94,20
294	77,40 (1,60)	3,60 (0,70)	81,00 (2,40)	95,60
295	50,90 (6,10)	4,10 (0,50)	55,00 (6,60)	92,50
299	109,0 (11,0)	6,80 (1,90)	115,0 (13,0)	94,10

Observa-se que as amostras apresentam em maior porcentagem MeHg (mais ou menos 90%) e Hg-i em menor porcentagem, não tendo sido detectado EtHg. Esses valores estão de acordo com Lannaccone, (2001), que propõe 80 a 95% de mercúrio na forma orgânica em indivíduos expostos a MeHg, sendo que tais valores podem sofrer grandes diferenças inter-individuais.

Após a quantificação das amostras de sangue citadas anteriormente, foi feita uma comparação do método de especificação de Hg por GC-ICP-MS desenvolvido,

com o método HPLC-ICP-MS já desenvolvido e publicado anteriormente (RODRIGUES et al., 2010; Estudo II). Os valores da comparação direta das duas metodologias estão apresentados na Figura 19. Observa-se que os valores obtidos por GC-ICP-MS estão concordantes com os valores obtidos por HPLC-ICP-MS, não havendo diferença estatística entre os valores dos dois métodos comparados utilizando teste t para 95% de confiança.

Figura 19: Comparação direta dos métodos de especiação de Hg em amostras de sangue, GC-ICP-MS (etilação) e HPLC-ICP-MS.

Foi também utilizado um gráfico de comparação de metodologias de acordo com Bland e Altman (1986, 1995) e apresentado na Figura 20.

Figura 20: Comparação de metodologias HPLC-ICP-MS e GC-ICP-MS para especiação de Hg em sangue utilizando gráfico comparativo proposto por Bland e Altman (1986, 1995); SD= Desvio padrão.

Observa-se também que os valores obtidos por GC-ICP-MS estão concordantes com os valores obtidos por HPLC-ICP-MS, não havendo diferença estatística entre eles utilizando a comparação proposta por Bland e Altman (1986).

Por fim, foi também feita uma comparação do método GC-ICP-MS proposto com outros métodos de especiação de Hg que utilizam Cromatografia gasosa, em amostras biológicas em geral. Observa-se na Figura 21 que o método proposto apresenta menor tempo de preparo de amostra/determinação quando comparado a outros métodos já existentes em literatura que utilizam especiação por GC-ICP-MS, sendo assim mais interessante para aplicação em rotina.

Figura 21: Comparação do método proposto para especiação de Hg por GC-ICP-MS com outros métodos existentes em literatura para especiação de amostras biológicas.

5.2.3- Instabilidade do Etilmercúrio em sangue:

Em todas as amostras de sangue analisadas não foi detectado etilmercúrio. Porém foi feito um estudo de estabilidade do etilmercúrio em amostras de sangue uma vez que no Estudo II do presente trabalho foi observado que essa espécie se converte a Hg-i (principalmente) e a MeHg após certo tempo em sangue. Sendo assim, foi utilizado um sangue base de carneiro com fortificação (Spike) de etilmercúrio $10\mu\text{g L}^{-1}$ e feita a incubação *overnight* (12 horas). Após esse tempo foi feita a especiação de mercúrio ($n=3$) utilizando a extração por microondas, derivatização por propilação e quantificação por GC-ICP-MS, sendo que, após incubação *overnight*, 47% do etilmercúrio foi convertido a Hg-i e 51% estava na forma de EtHg e 2% na forma de MeHg. Foi feito um outro experimento onde foi incubado também *overnight* EtHg $10\mu\text{g L}^{-1}$ (sem sangue) e após esse tempo foi feita a especiação de mercúrio ($n=3$) utilizando a extração por microondas, derivatização por propilação e quantificação por GC-ICP-MS, sendo que nesse caso não foi observada a conversão de EtHg a Hg-i.

Em um trabalho desenvolvido por Gibicar et al. (2009) foi feita a determinação de metilmercúrio e etilmercúrio em sangue de pacientes que utilizaram vacina contendo timerosal, sendo que a coleta de sangue foi realizada antes e após a vacinação. Observou-se que após a vacinação com o timerosal foram detectados traços de etilmercúrio no sangue dos pacientes, porém a concentração de mercúrio inorgânico foi de 10 a 20 vezes maior depois da vacinação quando comparado com os valores antes de receber a vacina, o que poderia indicar uma possível conversão desse etilmercúrio (EtHg) a mercúrio inorgânico *in vivo*.

Novos estudos de cinética do EtHg (ou timerosal) em sangue deverão ser feitos no futuro, assim como testes *in vivo* para que possa ser melhor elucidado o mecanismo cinético do EtHg em sangue de organismos humanos ou mesmo em animais.

6- Conclusões

6.1-Estudo I:

O método proposto com CV ICP-MS é mais adequado para a determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras de sangue e plasma devido a simplicidade do procedimento do preparo da amostra. Além disso, tal método pode ser alternativo para aqueles laboratórios clínicos equipados apenas com ICP-MS, eliminando a necessidade de aquisição de equipamentos adicionais dedicados para fracionamento de mercúrio.

6.2-Estudo II:

O método para especiação de Hg por HPLC-ICP-MS desenvolvido demonstrou ser simples e com um preparo de amostras rápido e simples, onde apenas 15 minutos são necessários para a extração de espécies de Hg. O reduzido número de etapas da extração faz com que ele seja menos propenso a contaminações. A aplicação do método para populações expostas a diferentes espécies de Hg é de suma importância nos estudos de toxicologia do mercúrio.

6.3- Estudo III:

O método desenvolvido apresenta um rápido preparo de amostras quando comparado com outros métodos de especiação por GC-ICP-MS. Possui a vantagem de utilizar pequena quantidade de solvente. Os valores obtidos por HPLC-ICP-MS e GC-ICP-MS foram concordantes na análise do material de referência certificado NIST 966 e outros materiais de referência. Além disso, não houve diferença estatística entre os dois métodos utilizando a comparação de métodos proposta por Bland e Altman (1986).

7-Referências Bibliográficas

ALBALAK, R.; CALDWELL, K.; JONES, R.; MILLER, G.;, Inorganic mercury determination in whole blood using on-line microwave digestion with flow injection mercury system (FIMS), **Atomic Spectroscopy**, 26, 234-240, 2005.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Disponível em: **www.anvisa.gov.br**, Brasília, Acesso em julho de 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br, Acesso em fevereiro de 2010.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles>. Acessado em janeiro de 2010.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**, 1ª edição, RiMa, São Carlos, SP, Brasil, 2003.

BARBOSA, F.; PALMER, C.D.; KRUG, F.J.; PARSONS, P. J.,. Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19, 1000-1005, 2004.

BATISTA, B.L.; RODRIGUES, J. L.; NUNES, J. A.; TORMEN, L.; CURTIUS, A.J., BARBOSA, F., Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS, **Talanta**, 76, 575-579, 2008.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L., GROTO, D.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature, **Analytica Chimica Acta**, 646, 23-29, 2009.

BARBOSA, F.; FILLION, M.; LEMIRE, M.; PASSOS, C.J.S.; RODRIGUES, J.L., PHILIBERT, A.; GUIMARÃES, J.R.; MERGLER, D., Elevated blood lead levels in a riverside population in the Brazilian Amazon, **Environmental Research**, 109, 594-599, 2009.

BAXTER, D. C.; RODUSHKIN, I.; ENGSTROM, E.; KLOCKARE, D.; WAARA, H., Methylmercury measurement in whole blood by isotope-dilution GC-ICPMS with 2 sample preparation methods. **Clinical Chemistry**, 53, 111-116, 2007.

BERGDAHL, I. A.; SCUTZ, A.; HANSSON, G. A., Automated determination of inorganic mercury in blood after sulfuric acid treatment using cold vapour atomic absorption spectrometry and an inductively heated gold trap., **Analyst**, 120, 1205-1209, 1995.

BERGLUND, M.; LIND, B.; BJORNBERG, K. A.; PALM, B.; EINARSSON, O.; VAHTER, M., Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. **Environmental Health**, 4, 20-31, 2005.

BIDONE, E.D.; CASTILHOS, Z.C.; SOUZA, T.M.C.; LACERDA, L.D.. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho river, Amapa State, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. **Water, Air and Soil Pollution**, 97, 9-15, 1997.

BISINOTI, C. M.; JARDIM, W. F., O Comportamento do Metilmercúrio (metilHg) no Ambiente, **Química Nova**, 27, 593-600, 2004.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D.G., Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, **The Lancet**, 327, 307-310, 1986.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G., Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading, **The Lancet**, 346, 1085-1087, 1995.

BRIDGES, C.C.; ZALUPS, R. K., "Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals", **Toxicology and applied Pharmacology**, 204, 274-308, 2005.

BRUNMARK, P.; SKARPING, G.; SCHUTZ, A., Determination of methylmercury in human blood using capillary gas chromatography and selected-ion monitoring, *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 573, 35-41, 1992.

BULSKA, H.; EMTEBORG, D. C.; BAXTER, W.; FRECH, D.; THOMASSEN, Y, Speciation of mercury in human whole blood by capillary gas chromatography with a microwave-induced plasma emission detector system following complexometric extraction and butylation, **Analyst**, 117, 657-663, 1992.

CABAÑERO ORTIZ, A. I.; MADRID, Y.; CÁMARA RICA, C. J. Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 17, 1595-1601, 2002.

CDC, **Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals**, NCEH Pub. No. 02-0716, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, p. 1–251, 2003.

CHEN, H. P.; PASCHAL, D. C.; MILLER, D. T.; MORROW, J. C., Determination of Total and Inorganic Mercury in Whole Blood by On-Line Digestion With Flow Injection, **Atomic Spectroscopy**, 19, 176-179, 1998.

CHEN, H.; CHEN, J.; JIN, X.; WEI, D., Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction, **Journal of Hazardous Materials**, 172, 1282-1287, 2009.

CHIOU, C.S.; JIANG, S.J.; DANADURAI, K. S. K., Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**; 56, 1133-1142, 2001.

CRISTOPHER, S. J. Development of Isotope dilution cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry and its application to the certification of mercury in NIST Standard Reference Materials, **Analytical Chemistry**, 73, 2190-2199, 2001.

EBDON, L.; PITTS, L.; CORNELLIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O. F. X.; QUEVAUVILLER, P., "The Trace Element Speciation for Environment, Food and Health", **The Royal Society of Chemistry**, 55-69, 2001.

FLAMENT, P.; BERTHO, M. L.; DEBOUDT, K.; VERON, A.; PUSKARIC, E., European isotopic signatures for lead in atmospheric aerosols: a source apportionment based upon $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ ratios, **The Science of the Total Environment**, 296, 35-57, 2002.

FILLION, M.; MERGLER, D.; PASSOS, C.J.S.; LARRIBE, F.; LEMIRE, M.; GUIMARÃES, J.R.D., A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon, **Environmental Health**, 5, 29-38, 2006.

FERNÁNDEZ, R. G.; BAYÓN, M. M.; ALONSO, J. I. G.; SANZ-MEDEL, A., Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Mass Spectrometry**, 35, 639-646, 2000.

GIBICAR, D.; LOGAR, M.; HORVAT, N.; MARN-PERNAT, A.; PONIKVAR, R.; HORVAT, M. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n -propyl) borate as derivatizing agent, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 388, 329-340, 2009.

GUO, T.; BAASNER, J., On-line microwave sample pretreatment for the determination of mercury in blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry **Talanta**, 40, 1927-1936, 1993.

HANNA, C.P.; TYSON, J. F.; MCINTOSH, S., Determination of total mercury in waters and urine by flow injection atomic absorption spectrometry procedures involving on- and off-line oxidation of organomercury species, **Analytical chemistry**, 65, 653-656, 1993.

HARRINGTON, C. F.; CATTERICK, T., Problems encountered during the development of a method for the speciation of mercury and methylmercury by high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 12, 1053-1056, 1997.

HARRINGTON, C.F.; MERSON, S.A.; D'SILVA, T.M.D. Method to reduce the memory effect of mercury in the analysis of fish tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, 505, 247-254, 2004.

HIPPLER, J.; HOPPE, H. W.; MOSEL, F.; RETTENMEIER, A. W.; HIRNER, A. V. Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC–ICP-MS and GC–MS techniques, **Journal of Chromatography B**, 877, 2465-2470, 2009.

HIGHT, S.; CHENG, J., Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and

inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation, **Analytica Chimica Acta**, 567, 160-172, 2006.

HU, Z.C.; HU, S.H.; GAO, S.; LIU, Y.S.; LIN, S.L., Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma mass spectrometry: a case of methanol and acetone, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 59, 1463-1470, 2004.

KAERCHER, L. E.; GOLDSCHMIDT, F.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L., Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell, **Spectrochimica Acta Part B**, 60, 705-710, 2005.

KATSOYIANNIS, I. A.; KATSOYIANNIS, A. A., Arsenic and other metal contamination of groundwaters in the industrial area of Thessaloniki, Northern Greece, **Environmental Monitoring and Assessment**, 123, 393-406, 2006.

KOPPENAAL, D. W.; EIDEN, G. C.; BARINAGA, C. J., J., Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19, 561-570, 2004.

KLAASEN, C. D.; WATKINS, U. B. **Toxicologia: A ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**. 5 ed., Editora McGraw-Hill, 2001, p. 603.

KRISHNA, M.V.B.; RANJIT, M.; KARUNASAGAR, D.; ARUNACHALAM, J., A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and

methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS, **Talanta**, 67, 70-80, 2005.

LANNACCONE, P. M., Toxicogenomics: "the call of the wild chip"., **Environmental Health Perspectives**, 109, A8-11, 2001.

LEAL, L. O.; ELSHOLZ, O.; FORTALEZA, R.; CERDA, V., Determination of mercury by multisyringe flow injection system with cold-vapor atomic absorption spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, 573, 399-405, 2006.

LI, Y.; LIU, S. J.; JIANG, D. Q.; JIANG, Y.; YAN, X. P., Gas Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Mercury Speciation in Seafood, **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 36, 793-798, 2008.

LIANG, L.; LAZOFF S., Evaluation of the procedure for alkaline digestion solvent estimation for methyl mercury artifact formation, **Talanta**, 48, 231-233, 1999.

LIN, L. Y.; CHANG, L. C.; JIANG, S. J., Speciation analysis of mercury in cereals by liquid chromatography chemical vapor generation inductively coupled plasma-mass spectrometry, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 6868-6872, 2008.

MAINVILLE N., WEBB J., LUCOTTE M., DAVIDSON R., BETANCOURT O., CUEVA E., MERGLER, D. Decrease of soil fertility and release of mercury following deforestation in the Andean Amazon, Napo River Valley, Ecuador, **Science of The Total Environment**, 368,1, 88-98, 2006.

MARQUES, R.C.; DOREA, J.G.; FONSECA, M.F.; BASTOS, W.R.; MALM, O. Hair mercury in breast-fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines, **European Journal of Pediatrics**, 166, 935-941, 2007.

MENG, W.; WEIYUE, F.; JUNWEN, S.; FANG, Z.; BING, W.; MOTAO, Z.; BAI, L.; YULIANG, ZHIFANG, Z.C., Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC–ICP–MS, **Talanta**, 71, 2034-2039, 2007.

MONTASER, A., **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, Wiley-VCH, 1998, p.155-170.

MORTON, J.; CAROLAN, V. A.; GARDINER, P. H.E., The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 17, 377-381, 2002.

MORETON, J. A.; DELVES, H. T., Simple direct method for the determination of total mercury levels in blood and urine and nitric acid digests of fish by inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 13, 659-665, 1998.

NEVADO, J. J. B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R.; BERNARDO, F. J. G.; MORENO, M. J., Indirect Mercury Speciation in Biological Tissues by Closed-Vessel Microwave-Assisted Digestion and Flow-Injection Cold-Vapor Atomic Fluorescence Detection, **Analytical Letters**, 39, 2657-2669, 2006.

NEVADO, J. J. B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R.; MORENO, M. J.; NASCIMENTO, J. L. M.; HERCULANO, A. M.; CRESPO-LÓPES, M. E., Mercury speciation analysis on cell lines of the human central nervous system to explain genotoxic effects, **Microchemical Journal**, 93, 12–16, 2009.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A; CADORE, S.; BARMES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media, **Spectrochimica Acta Part B**, 61, 465–495, 2006.

PALMER, C.D.; LEWIS, M.E.; GERAGHTY C.M.; BARBOSA, F.; PARSONS, P. J.. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta part B**, 61, 980-990, 2006.

PARK, C.J.; DO, H., Determination of inorganic and total mercury in marine biological samples by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry after tetramethylammonium hydroxide digestion, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 23, 997-1002, 2008.

PARSONS P.; BARBOSA F., Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectrometry**, 62, 992-1003, 2007.

POINT, D.; DAVIS, W. C.; ALONSO J. I G.; MONPERRUS M.; CHRISTOPHER S. J.; DONARD O. F. X.; BECKER P. R.; WISE S. A., Simultaneous determination of inorganic mercury, methylmercury, and total mercury concentrations in cryogenic

fresh-frozen and freeze-dried biological reference materials, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 389, 787-798, 2007.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J., Determination of volatile elements in biological materials by isotopic dilution ETV-ICP-MS after dissolution with tetramethylammonium hydroxide or acid digestion **Talanta**, 51, 903-911, 2000.

PROHASKA, C.; POMAZAL, K.; STEFFAN, I., Determination of Ca, Mg, Fe, Cu, and Zn in blood fractions and whole blood of humans by ICP-OES, **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry** , 367, 5, 479-484, 2000.

PRUSZKOWSKI, E.; NEUBAUER, K.; THOMAS, R., An overview of clinical applications by inductively coupled plasma mass spectrometry, **Atomic Spectroscopy**, 19, 111-115, 1998.

QVARNSTROM J., FRECH W., Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 17, 1486–1491, 2002.

RAHMAN, G. M.M.; FAHRENHOLZ, T.; KINGSTON, H.M.S., Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate methods for efficiencies, recoveries, and quantification of mercury species transformations in human hair, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 24, 83-92, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, 27, 5, 771-780, 2004.

ROBBINS, W. B.; CARUSO, J. A.; Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis, **Analytical Chemistry**, 51, 889A-898A, 1979.

RODRIGUES, J.L.; BATISTA, B.L.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D.; BARBOSA, F. Trace element levels in whole blood of riparian villagers of the Brazilian Amazon, **Science of The Total Environment**, 407, 4168-4173, 2009.

RODRIGUES, J.L.; NUNES, J. A.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S.S.; BARBOSA, F., A fast method for the determination of 16 elements in hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 23, 992-996, 2008.

RODRIGUES, J. L.; TORRES, D. P.; SOUZA, V. C. O.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S. S.; CURTIUS, A. J.; BARBOSA, F. Determination of total and inorganic Mercury in whole blood by cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (CV ICP-MS) with alkaline sample preparation, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 24, 1414-1420, 2009b.

RODRIGUES, J. L.; SOUZA, S. S.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. Methylmercury and inorganic Mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure, **Talanta**, 80, 1158-1163, 2010.

ROSEN, A. L.; HIETFTJE, G. M., Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation, **Spectrochimica Acta Part B**, 59, 135-146, 2004.

SÁNCHEZ, L. R. B.; ENCINAR, J. R.; MARTÍNEZ, J. I. F.; SANZ-MEDEL, A., Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction–gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrix effects evaluation, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 59, 59-66, 2004.

SANTOYO, M. M.; FIGUEROA, A. A.; WROBEL, K.; WROBEL, K., Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi^{3+} as internal standard, **Talanta**, 79, 706-711, 2009.

SCHULZ, C.; ANGERER, J.; EWERS, U.; HEUDORF, U.; WILHELM, M., Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German Environmental Survey on Children 2003-2006 (GerES IV). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 212, 6, 637-647, 2009.

SEGADE, S.R.; BENDICHO, B., Selective Reduction Method for Separate Determination of Inorganic and Total Mercury in Mussel Tissue by Flow-Injection Cold Vapor Technique, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 42, 245-252, 1999.

SEGADE, S.R.; TYSON, J.R. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent, **Spectrochimica Acta Part B**, 58, 797-807, 2003.

SEILER, H.G.; SIGEL, H.; SIGEL, A. **Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds**. New York: Copyright, 420-431, 1987.

SILVA, R. G. L.; WILLIE, S. N.; STURGEON, R. E.; SANTELLI, R. E.; SELLA, S. M. Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry, **The Analyst**, 124, 1843-1846, 1999.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5a.ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2002, 836p.

SMAELE, T.; MOENS, L.; DAMS, R.; SANDRA, P.; EYCKEN, J. V.; VANDYCK, J. V. Sodium tetra(n-propyl)borate: a novel aqueous in situ derivatization reagent for the simultaneous determination of organomercury, -lead and -tin compounds with capillary gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, 793, 99-106, 1998.

SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A., Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, 856, 243-258, 1999.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRINBERG, P.; CAMPOS, R. C., A geração química de vapor em espectrometria atômica, **Química Nova**, 25, 6B, 1132-1144, 2002.

TAO, G.H.; WILLIE, S.N.; STURGEON, R.E., Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion, **The Analyst**, 123, 1215-1218, 1998.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L.G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H. P.; LOBINSKI, R., Guidelines for terms related to chemical speciations and fractionation of elements : definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), **Pure and Applied Chemistry**, 72, 1453-1470, 2000.

TORRES, D. P.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A., S.; CURTIUS, A., J., Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 20, 289-294, 2005.

TORRES, D. P.; BORGES, D. L. G.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 24, 1118-1122, 2009.

TSENG, C. M.; DIEGO, A. DE; MARTIN, F. M. AMOUROUX, D.; DONARD, O. F. X. Rapid Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Biological Reference

Materials by Hydride Generation, Cryofocusing, Atomic Absorption Spectrometry After Open Focused Microwave-assisted Alkaline Digestion, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 12, 743-750, 1997.

VALLANT, B.; KADNAR, R.; GOESSLER, W., Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 22, 322-325, 2007.

WANG, T., Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC-ICP-MS), **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 30, 807-831, 2007.

WU, L.; ZHENG, C.; MA, Q.; HU, C.; HOU, X., Chemical Vapor Generation for Determination of Mercury by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, **Applied Spectroscopy Reviews**, 42, 79-102, 2007.

YIN, Y. G.; CHEN, M.; PENG, J. F.; LIU, J. F. GIANG, G. B., Dithizone-functionalized solid phase extraction–displacement elution-high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury speciation in water samples, **Talanta**, 81, 1788-1792, 2010.

ZALUPS, R.K. – Molecular interactions with mercury in the kidney, **Pharmacological Reviews**, 52, 1, 113-144, 2000.

ZIMMER, H.; LUDWIG, H.I.; BADER, M.; BAILER, J.; EICKHOLZ, P.; STAEHLE, H. J.; TRIEBIG, G., Determination of mercury in blood, urine and saliva for the biological

monitoring of an exposure from amalgam fillings in a group with self-reported adverse health effects, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 205, 3, 205-211, 2002.

ZHOU, Y.; ZANÃO, R. A.; BARBOSA, F.; PARSONS, P. J.; KRUG, F. J., Investigations of a W-Rh permanent modifier for the determination of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry **Spectrochimica Acta Part B**, 57, 1291-1300, 2002.

8- ANEXO

Trabalhos publicados relacionados com a Tese:

✓ Relacionado com o Estudo I:

RODRIGUES, J. L.; TORRES, D. P.; SOUZA, V. C. O.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S. S.; CURTIUS, A. J.; BARBOSA, F., Determination of total and inorganic Mercury in whole blood by cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (CV ICP-MS) with alkaline sample preparation, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 24, 1414-1420, 2009.

✓ Relacionado com o Estudo II:

RODRIGUES, J. L.; SOUZA, S. S.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F., Methylmercury and inorganic Mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma massa spectrometry and a fast sample preparation procedure, **Talanta**, 80, 1158-1163, 2010.

SOUZA, S. S.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F., A fast sample preparation procedure for mercury speciation in hair samples by high-performance liquid chromatography coupled to ICP-MS, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 79-83, 2010.

RODRIGUES, J. L.; SERPELONI, J. M.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F., Identification and distribution of Mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury, **Archives of Toxicology**, DOI 10.1007/s00204-010-0538-4, 2010, No prelo.

✓ **Relacionado com o Estudo III:**

RODRIGUES, J. L.; ALVAREZ, C. R.; FARIÑAS, N. R.; NEVADO, J. J. B.; BARBOSA, F.; MARTIN-DOIMEADIOS, R. C. R., Mercury Speciation in Whole Blood by Gas Chromatography Coupled to ICP-MS with a Fast Microwave-Assisted Sample Preparation Procedure, Enviado para publicação em ***Journal of Analytical Atomic Spectrometry*** em 2010.